

Sibele Morais Miyata Erhart

**FREQUÊNCIA E ANÁLISE DO HPV EM PACIENTES COM
CÂNCER DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmácia, Departamento de Análises Clínicas, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Erhart, Sibele Moraes Miyata
Frequência e análise do HPV em pacientes com câncer de
células escamosas da cavidade oral / Sibele Moraes Miyata
Erhart ; orientador, Alexandre Sherlley Casimiro Onofre -
Florianópolis, SC, 2014.
95 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. Papilomavirus Humano. 3. PCR. 4. Câncer
de boca. I. Onofre, Alexandre Sherlley Casimiro. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia. III. Título.

*Aos meus pais Irio e Salete e ao meu marido Jhonatan,
pelo amor incondicional, apoio e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais Irio e Salete, meus primeiros professores, que me ensinaram a buscar meus sonhos e estabeleceram minha base para chegar até aqui.

Ao meu marido Jhonatan, pelo amor e compreensão e por estar ao meu lado em todos os momentos desta jornada.

Ao meu orientador prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre pela proposta deste projeto e orientação.

À profa. Dra. Maria Luiza Bazzo por me receber em seu laboratório, proporcionando todas as ferramentas necessárias para o desenvolvimento deste estudo.

À profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero e ao Laboratório de Patologia Bucal da UFSC por fornecerem as amostras. Sem esta parceria este trabalho não seria possível.

Ao prof. Dr. Marcos Machado pelo auxílio na análise estatística.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias, especialmente à Lisléia Golfetto, Eduardo Venâncio Alves e Manoela Lira Reis pelo auxílio na parte prática e à Letícia Muraro Wildner pela amizade, dicas e ensinamentos.

À profa. Dra. Flávia Martinello e profa. Dra. Thaís Cristine Marques Sincero pela oportunidade da realização do auxílio à docência, contribuindo para o meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da UFSC e à CAPES pela possibilidade da realização do mestrado.

Aos meus queridos amigos, pelos momentos de alegria, descontração e desabafo, pela força e encorajamento para que eu chegue cada vez mais longe.

E à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho... Muito obrigada!

RESUMO

A infecção pelo HPV é um fator de risco independente para o desenvolvimento dos carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço (CCECP). Estudos recentes demonstram que os CCECP HPV positivos representam uma classe diferenciada de tumores, resultando em implicações clínicas e biológicas favoráveis no tratamento e prognóstico dos pacientes. Ainda não existe um consenso sobre o método mais adequado para a detecção do HPV nas diversas amostras biológicas. Além disso, no Brasil existem poucos estudos a respeito da associação do HPV nos tumores da cavidade oral e, assim como no âmbito global, seus resultados são discordantes. O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização dos conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) GP5+/6+, MY09/11 e PGMY09/11 para a detecção do DNA do HPV pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e verificar a prevalência da infecção pelo HPV nos pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral (CCEO) atendidos no Ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para isto, foram coletadas amostras de tecido oral fixado em formalina e embebido em parafina (FFEP) dos pacientes atendidos no período de setembro de 2006 a dezembro de 2013, com resultados histopatológicos positivos para CCEO. As amostras foram submetidas à PCR convencional utilizando os *primers* GP5+/6+, MY09/11 e PGMY09/11 e as amostras negativas nestas reações foram submetidas à *nested* PCR com os *primers* MY/GP+ e PGMY/GP+. Nenhuma das amostras (0,0%) foi detectada positiva para o HPV nas PCRs com os *primers* GP5+/6+ e MY09/11, enquanto 13% (3/23) foram positivas para o vírus quando foi utilizado o conjunto de *primers* PGMY09/11. O uso da *nested* PCR PGMY/GP+ aumentou a detecção do HPV para 17,4% (4/23), enquanto na *nested* PCR MY/GP+ nenhuma das amostras (0,0%) foi positiva para o vírus. Com isso, apenas 17,4% do total de casos de CCEO foram associados ao HPV, sendo que a maioria dos casos (73,9%) foi associada ao consumo de tabaco e/ou álcool. Não foi observada associação estatística entre a presença do HPV e os outros fatores de risco para o CCEO (sexo, idade, consumo de álcool, tabaco e outros). A *nested* PCR PGMY/GP+ se mostrou a técnica mais adequada para a pesquisa do DNA do HPV em amostras FFEP de CCEO.

Palavras chave: Papilomavírus Humano, detecção, PCR, câncer de boca, carcinoma de células escamosas.

ABSTRACT

HPV is an independent risk factor for the development of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). Recent studies have shown that HPV-positive HNSCC represents a distinct group of tumors with favorable biological and clinical behavior which leads to a better treatment response and survival outcomes. However, there is still no consensus on the most appropriate method for the detection of HPV in HNSCC. Besides, in Brazil there are only a few studies about the role of HPV in HNSCC, and even as globally, the results are conflicted. The aim of this study was to evaluate the use of GP5+/6+, MY09/11 and PGMY09/11 primer sets for the detection of HPV DNA by polymerase chain reaction (PCR) and to determine the rate of HPV infections in patients with oral squamous cell carcinomas (OSCC) from Stomatology Clinic of Federal University of Santa Catarina (UFSC). The specimens were taken from formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) oral tissues from patients treated between September 2006 and December 2013. The specimens were tested using simple PCR with GP5+/6+, MY09/11 and PGMY09/11 primer sets. All negative samples were subsequently tested by nested PCR MY/GP+ and PGMY/GP+. The PGMY09/11 primers detected HPV DNA in 13.0% (3/23) of the samples while GP5+/6+ and MY09/11 primers did not detect the virus in any samples. The prevalence of HPV raise to 17.4% (4/23) with the use of nested PGMY/GP+, but the nested MY/GP+ was not able to detect the virus DNA in any samples. In the study population, HPV detection rate was 17.4%. Most of the the total OSCC cases (73.9%) was related with tobacco and/or alcohol use, but no statistical association was observed between HPV infection and other risk factors for OSCC (sex, age, alcohol use, tobacco use, and others). PGMY/GP+ are the preferred primer set for the detection of HPV DNA by PCR using FFPE samples from OSCC.

Keywords: Human Papillomavirus, detection, PCR, oral cancer, squamous cell carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV 16.....	33
Figura 2 - Relação evolucionária entre os tipos de HPVs.....	35
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida do HPV.....	38
Figura 4 - Transformação maligna causada pela oncoproteína E7.....	41
Figura 5 - Transformação maligna causada pela oncoproteína E6.....	42
Figura 6 - Fluxograma das PCRs realizadas.	52
Figura 7 - PCR com iniciadores PCO3/4	58
Figura 8 - PCR com iniciadores GP5+/6+	59
Figura 9 - PCR com iniciadores MY09/11.....	59
Figura 10 - PCR com iniciadores PGMY09/11.....	60
Figura 11 - <i>Nested</i> PCR com iniciadores PGMY/GP+	60
Figura 12 - Número de casos de CCEO por faixa etária.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo esquemático da classificação clínica TNM.	29
Tabela 2 - Grupamento da classificação TNM por estádios.....	30
Tabela 3 - Relação e sequências dos <i>primers</i> utilizados nas PCRs.	53
Tabela 4 - Interpretação da concordância do teste <i>kappa</i>	57
Tabela 5 - Concordância dos resultados entre as PCRs.....	62
Tabela 6 - Concordância dos resultados entre as <i>nested</i> PCRs	62
Tabela 7 - Associação entre a infecção pelo HPV e outros fatores de risco para o CCEO.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR	Coloração de prata para regiões organizadoras de nucléolos
BSA	Soro Albumina Bovina
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCEO	Carcinoma de células escamosas da cavidade oral
CCECP	Carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno di-amino tetra acético
FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
FFEP	Fixado em formalina e embebido em parafina
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
HC2	Captura híbrida 2
HPV	Papilomavírus humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICTV	<i>International Committee on the Taxonomy of Viruses</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
LBMM/UFSC	Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da Universidade Federal de Santa Catarina
LPB/UFSC	Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina
LCR	<i>Long Control Region</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
pb	Pares de bases
PV	Papillomavirus
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pRb	Proteína supressora tumoral do retinoblastoma
q.s.p.	Quantidade suficiente para
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase reversa
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results Program</i>
SUS	Sistema Único de Saúde

TE
UFSC
UV
V

Tris-EDTA
Universidade Federal de Santa Catarina
Ultravioleta
Volts

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 CÂNCER DE BOCA	23
2.1.1 Caracterização e epidemiologia.....	23
2.1.2 Fatores de risco.....	25
2.1.3 Diagnóstico	26
2.1.4 Prognóstico e tratamento	29
2.1.5 Câncer de boca e HPV	31
2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	33
2.2.1 Estrutura do genoma viral do HPV	33
2.2.2 Classificação do HPV.....	34
2.2.3 História natural da infecção pelo HPV e a carcinogênese oral.....	36
2.2.4 Ciclo de vida do HPV.....	38
2.2.5. Mecanismos moleculares da carcinogênese do HPV	40
2.2.6 Métodos de detecção do HPV em câncer de cabeça e pescoço....	43
3 JUSTIFICATIVA.....	47
4 OBJETIVOS	48
4.1 OBJETIVO GERAL	48
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
5 MATERIAIS E METODOS	49
5.1 ASPECTOS ÉTICOS	49
5.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO.....	49
5.3 AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	49
5.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	50
5.4.1 Remoção da parafina	50
5.4.2 Extração do DNA	50
5.4.3 Quantificação e pureza do DNA extraído	51
5.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	51
5.5.1 PCR com os iniciadores PCO3/4 para controle de qualidade do DNA extraído	54
5.5.2 PCR com iniciadores GP5+/6+ para detecção do HPV.....	54
5.5.3 PCR com iniciadores MY09/11 e nested PCR MY/GP+ para detecção do HPV	55
5.5.4 PCR com iniciadores PGMY09/11 e nested PCR PGMY/GP+ para detecção do HPV	55
5.5.5 Separação eletroforética	56
5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	56
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
6 RESULTADOS.....	58

6.1 AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	58
6.2 QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO DNA EXTRAÍDO	58
6.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	58
6.3.1 PCR com os iniciadores PCO3/4 para controle de qualidade do DNA extraído.....	58
6.3.2 PCR com iniciadores GP5+/6+ para detecção do HPV	59
6.3.3 PCR com iniciadores MY09/11 e nested PCR MY/GP+ para detecção do HPV.....	59
6.3.4 PCR com iniciadores PGMY09/11 e nested PCR PGMY/GP+ para detecção do HPV.....	60
6.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	61
6.5 ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA ENTRE AS PCRs.....	62
6.6 PREVALÊNCIA DO HPV E SUA ASSOCIAÇÃO COM OUTROS FATORES DE RISCO.....	62
7 DISCUSSÃO	64
8 CONCLUSÃO	70
9 PERSPECTIVAS	71
REFERÊNCIAS.....	72
ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos.....	93

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca é o 15º câncer com maior incidência em todo o mundo, sendo o 11º mais frequente em homens e o 17º mais frequente em mulheres. Estima-se que anualmente ocorram, no total, mais de 300 mil novos casos e mais de 145 mil mortes por esta neoplasia (FERLAY et al., 2012).

O Brasil está entre os três países com maior incidência de câncer da cavidade oral, juntamente com a Índia e o Paquistão (CANCELA et al., 2010), sendo esperados mais de 15 mil novos casos no país no ano de 2014 (BRASIL, 2014).

O câncer de boca é um problema global de saúde pública, pois apesar do fácil acesso à cavidade oral para a realização do rastreamento da doença e da possibilidade do diagnóstico precoce, a maioria dos casos é diagnosticada em estádios avançados, o que contribui com as baixas taxas de sobrevida dos pacientes (BARNES et al., 2005).

Os principais fatores de risco tradicionalmente associados ao câncer da cabeça e pescoço, nos quais se inclui o câncer da cavidade oral, são o consumo de tabaco e álcool. Recentemente, foi estabelecido que a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) age como fator importante e independente no desenvolvimento destes tumores (ANANTHARAMAN et al., 2014; SMITH et al., 2012).

Desde que foi primeiramente proposto por Syrjänen et al. em 1983, o envolvimento do HPV na carcinogênese oral tem sido controverso, mas em 2007 a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) publicou evidências suficientes que comprovam o papel do HPV no câncer da cavidade oral e da orofaringe (IARC, 2007).

Ao longo dos anos, diversos estudos têm sido realizados a fim de estabelecer a prevalência da infecção pelo HPV e suas implicações no câncer da cabeça e pescoço (ANG et al., 2010; D'SOUZA et al., 2007; FAKHRY et al., 2008; GIOVANNELLI et al., 2002; KOUVOUSI et al., 2013; KREIMER et al., 2005; LIANG et al., 2008). A partir de então se observou que as infecções pelo HPV resultam numa classe diferenciada de tumores, apresentando grande relevância clínica para os pacientes.

Os pacientes com câncer da cavidade oral associado ao HPV são, em geral, mais jovens, têm menor exposição ao tabaco e álcool, iniciam a vida sexual mais precocemente e têm maior número de parceiros sexuais do que os pacientes com câncer HPV negativo. Além disso, a infecção pelo HPV mostrou ter grande impacto no tratamento e prognóstico, uma vez que pacientes com tumores HPV positivos apresentam melhores respostas à quimioterapia e radioterapia, maior

sobrevida e menor risco de morte e de recorrência da doença quando comparados aos pacientes com tumores HPV negativos (ANG et al., 2010; DESCHLER et al., 2014; FAKHRY et al., 2008; GILLISON et al., 2008; VIDAL, GILLISON, 2008).

Com isso, é concebível que num futuro próximo as estratégias de tratamento tenham como alvo vias moleculares específicas que diferenciem os carcinomas associados dos não associados ao HPV (VENUTI, PAOLINI, 2012).

Entretanto, o método ideal para a detecção do HPV nas diversas amostras clínicas ainda não foi estabelecido. Assim, estudos utilizam diversas técnicas para esta análise, gerando resultados discrepantes na prevalência do vírus, com variações de 0% a 100% (CASTRO, BUSSOLOTI FILHO, 2006; KOUVOUSI et al., 2013; KOYAMA et al., 2007; LIANG et al., 2008; NÄSMAN et al., 2009; RIVERO, NUNES, 2006; TERMINE et al., 2008; WESTRA, 2014).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE BOCA

2.1.1 Caracterização e epidemiologia

O câncer da cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo (FERLAY et al., 2012) e inclui regiões anatômicas como a boca, orofaringe e laringe. Dentre as lesões malignas que atingem estas regiões, o carcinoma epidermóide ou carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo histológico mais comum, compreendendo mais de 90% dos carcinomas da cabeça e pescoço em homens e mais de 83% em mulheres (COOPER et al., 2009; HECK et al., 2010).

O câncer de boca é a denominação que inclui o câncer de lábios e da cavidade oral e representa uma causa importante de morbimortalidade uma vez que a maioria dos casos é diagnosticada em estádios avançados da doença (BRASIL, 2008).

As regiões anatômicas mais afetadas pelo câncer de boca são a língua e o assoalho bucal (CANCELA et al., 2010). Seus principais sintomas são o aparecimento de feridas que não cicatrizam em uma semana, ulcerações superficiais menores que 2 cm de diâmetro, indolores e que podem ou não sangrar, e manchas brancas ou vermelhas nos lábios ou na mucosa bucal. Além disso, dificuldade para falar, mastigar e engolir, emagrecimento acentuado, dor e presença de linfadenomegalia cervical podem ser sinais de câncer de boca em estágio avançado (BRASIL, 2012).

Anualmente, no mundo, são estimados quase 200 mil novos casos de câncer de boca em homens e mais de 100 mil novos casos em mulheres, com mortalidade de aproximadamente 100 mil e 48 mil, para cada gênero respectivamente (FERLAY et al., 2012).

O risco do desenvolvimento do câncer de boca aumenta com a idade e aproximadamente 70% dos casos ocorrem em indivíduos com mais de 50 anos. Apenas 4% a 6% dos casos ocorrem em pessoas menores de 40 anos, porém em países de alta incidência são relatados muitos casos nesta população mais jovem (ANANTHARAMAN, 2014; BRASIL, 2008; LLEWELLYN et al., 2001; WARNAKULASURIYA, 2009).

As taxas de incidência e mortalidade para o câncer de boca apresentam grande variação entre os países e também dentro do mesmo país, o que é atribuído, principalmente, aos hábitos de risco mais

comuns em cada região, características socioeconômicas, expectativa de vida, fatores ambientais, raça, educação preventiva e qualidade da assistência médica (BRENER et al., 2007). Devido a estes fatores a prevalência do câncer de boca é proporcionalmente maior em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos, sendo que as maiores taxas são observadas no Paquistão, Índia, Brasil, Tailândia e Eslováquia (CANCELA et al., 2010).

Na maioria dos países, o câncer de boca atinge predominantemente os homens, sendo que a diferença da incidência entre os gêneros é atribuída ao fato de que os homens geralmente adquirem hábitos de risco, como tabagismo e alcoolismo, de forma mais intensa do que as mulheres (WARNAKULASURIYA, 2009).

A maior incidência do câncer de boca ocorre no sul e sudeste da Ásia, em que o hábito de mascar noz de areca, betel e tabaco é muito comum e constitui o principal fator de risco nestas regiões. Em países como a Índia, Sri Lanka, Paquistão e Bangladesh, o câncer de boca é o mais comum em homens, sendo responsável por mais de 25% dos novos casos de câncer. Na Índia, por exemplo, mais de 100 mil novos casos e mais de 50 mil mortes por câncer de boca são registrados por ano (CANCELA et al., 2010; WARNAKULASURIYA, 2009; FERLAY et al., 2012).

Nos países desenvolvidos, a maior incidência do câncer de boca ocorre na França, atingindo aproximadamente seis mil novos casos entre homens e mulheres por ano, o que corresponde a 15 vezes mais do que a Grécia, o país de menor incidência da Europa, com pouco menos de 400 novos casos anuais (CANCELA et al., 2010; FERLAY et al., 2012).

A *Surveillance, Epidemiology, and End Results Program* (SEER) estima que nos Estados Unidos da América (EUA) ocorram mais de 42 mil casos de câncer da cavidade oral e da orofaringe no ano de 2014, representando 2,5% de todos os novos casos de câncer no país, e mais de oito mil mortes por estas neoplasias, o que corresponde a 1,4% das mortes por câncer nos EUA (SEER, 2014).

Na América do Sul, os países de maior incidência de câncer da cavidade oral são o Brasil, Argentina e Uruguai, sendo que as maiores taxas são observadas no Brasil, onde o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima que ocorram 11.280 novos casos em homens e 4.010 em mulheres, no ano de 2014 (BRASIL, 2014; CANCELA et al., 2010; WARNAKULASURIYA, 2009).

No Brasil, a maior incidência se dá nas regiões Sudeste e Nordeste em que, sem considerar os tumores de pele não melanoma, é o quarto mais frequente em homens (15,48/100 mil e 7,16/100 mil,

respectivamente) e o nono mais frequente em mulheres (4,88/100 mil e 3,72/100 mil, respectivamente). Na região Sul ocupa a sexta colocação para homens (15,21/100 mil) e a 15ª para as mulheres (3,09/100 mil) (BRASIL, 2014).

2.1.2 Fatores de risco

Os principais fatores de risco do câncer da cabeça e pescoço, em especial do câncer de células escamosas da cabeça e pescoço (CCECP), são o consumo de tabaco e álcool (LEE et al., 2013; SMITH et al., 2012) e as infecções pelo HPV (GIULIANO et al., 2014; LAJER et al., 2010). Estudos demonstram que o risco do desenvolvimento destes tumores apresenta uma forte relação dose resposta com a frequência, duração e concentração do consumo do tabaco e álcool (LEE et al., 2013) e que a infecção pelo HPV aumenta o risco do desenvolvimento do CCECP em casos associados ou não ao consumo destas substâncias (MORK et al., 2001; SMITH et al., 2012).

Um dos mecanismos da carcinogênese do tabaco é a produção de substâncias cancerígenas, como as nitrosaminas e benzopirenos que causam mutações no gene p53. Enquanto isso, os efeitos do álcool não são completamente elucidados, mas sabe-se que os acetaldeídos, produtos do seu metabolismo, possuem ação mutagênica e carcinogênica, interferindo na síntese e reparo do DNA (PÖSCHL, SEITZ, 2004; RAMSHANKAR, KRISHNAMURTHY, 2013).

Além do fumo do cigarro, forma mais comum do consumo do tabaco em países desenvolvidos, o tabaco sem fumaça, mascado ou inalado, constitui um fator de risco importante no desenvolvimento da doença. Um estudo conduzido na Índia, onde o uso do tabaco sem fumaça é particularmente relevante, mostrou que o hábito de mascar tabaco combinado ao fumo pode aumentar em até 12 vezes o risco do desenvolvimento do câncer de boca (ANANTHARAMAN et al., 2014).

Apesar do álcool e tabaco agirem como fatores de risco independentes entre si, o efeito sinérgico dessa combinação é bem estabelecido (HASHIBE et al., 2009; IARC, 2012; SMITH et al., 2012). O mecanismo exato para esta sinergia permanece indefinido, mas sabe-se que o álcool age como solvente, aumentando a penetração de compostos carcinogênicos na mucosa oral e suprimindo a reparação do DNA após a exposição às nitrosaminas (PÖSCHL, SEITZ, 2004).

Ainda, em países em que é comum mascar betel e noz de areca, estes hábitos constituem os riscos mais importantes para o CCECP (HASHIBE et al., 2009).

O câncer de boca também pode ser associado, com menor relevância, às condições de higiene e saúde oral (GUHA et al., 2007), irritação mecânica crônica (TEZAL et al., 2009) e dieta deficiente em frutas e vegetais (FRANCESCHI et al., 1999) e, em se tratando do câncer dos lábios, a exposição prolongada à radiação solar ultravioleta (UV) atua como o principal fator de risco, sendo responsável por aproximadamente 50% destes casos (GALLAGHER et al., 2010).

Além disso, a susceptibilidade genética também pode contribuir para o desenvolvimento do câncer em pacientes que não apresentam outros fatores de risco, mas os mecanismos desta susceptibilidade ainda não são completamente elucidados (HO et al., 2007).

2.1.3 Diagnóstico

2.1.3.1 Exame clínico

A avaliação inicial de um paciente com suspeita de câncer de boca pode ser relativamente simples e deve incluir a inspeção visual e palpação de todas as superfícies mucosas, palpação bimanual do assoalho bucal e avaliação do pescoço para verificar o envolvimento dos linfonodos. Além disso, a anamnese completa, incluindo o uso de álcool, tabaco e higiene oral, deve ser registrada (GENDEN et al., 2010; BARNES et al., 2005).

O INCA recomenda que pessoas com fatores de risco, ou seja, com mais de 40 anos, fumantes e que consomem álcool regularmente realizem o exame da boca, no mínimo, uma vez ao ano com o intuito de descobrir lesões pré malignas ou malignas em suas fases iniciais (BRASIL, 2002).

Como a cavidade oral é facilmente acessível e lesões anormais podem ser facilmente detectadas sem a necessidade de instrumentos especiais, o rastreamento do câncer de boca por meio da inspeção visual, seja por profissionais da saúde ou mesmo pela auto inspeção, é recomendado como meio para a detecção precoce, principalmente em países com alta incidência da doença (MATHEW et al., 1995; SANKARANARAYANAN et al., 2000). Contudo, um problema inerente no rastreamento do câncer de boca é que a inspeção visual frequentemente não é capaz de diferenciar lesões displásicas e/ou câncer de lesões benignas, por isso outras formas de diagnóstico são necessárias (MEHROTRA et al., 2011).

Com isso, estudos recentes tem avaliado a utilização de outros métodos para auxiliar na detecção de células malignas na cavidade oral.

Em geral, estes métodos analisam o conteúdo de DNA celular ou padrões específicos da expressão de proteínas como, por exemplo, a coloração de prata para regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR), a análise computadorizada de imagens (OralCDx), a citometria de imagem do DNA, a imunocitoquímica e a hibridização *in situ* (ISH) (DRIEMEL et al., 2007B; HANEMANN et al., 2011; MARAKI et al., 2004; ONOFRE et al., 2008; REMMERBACH et al., 2004; SCIUBBA, 1999).

2.1.3.2 *Análise histopatológica*

O diagnóstico definitivo do câncer de boca somente pode ser feito pela histopatologia do tecido bucal obtido por biópsia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013; BRASIL, 2002). Porém, muitas lesões orais só são submetidas à biópsia quando apresentam sintomas ou aspectos típicos de malignidade. Enquanto isso, muitas lesões cancerosas em estágio inicial são observadas, mas não são corretamente diagnosticadas. Isto pode explicar, em parte, o motivo pelo qual mais de 50% dos tumores orais são diagnosticados em estádios avançados (SCHNETLER, 1992; SCIUBBA, 1999).

O tipo de biópsia é indicado de acordo com a extensão da lesão. Em casos de lesões grandes a biópsia deve ser incisional e deve-se coletar uma parte do tecido da região mais suspeita, evitando-se regiões necróticas ou ulceradas e biopsiando mais de um local. No caso de lesões pequenas que são inteiramente e facilmente ressecáveis, deve ser feita a biópsia excisional que é, ao mesmo tempo, diagnóstica e terapêutica por retirar toda a área da lesão (BRASIL, 2002; BARNES et al., 2005).

Assim que se define o diagnóstico, exames complementares de imagem devem ser realizados a fim de determinar o estadiamento do tumor e a presença de metástase, o que pode ser feito, por exemplo, por radiografias, tomografias computadorizadas ou ressonância magnética (GENDEN et al., 2010).

2.1.3.3 *Azul de toluidina*

O azul de toluidina é uma substância amplamente utilizada para auxiliar na avaliação do potencial maligno de lesões visíveis da cavidade oral e determinar a extensão da lesão, direcionando a área a ser biopsiada (EPSTEIN et al., 1992). Trata-se de um corante básico que se difunde nas células e cora os ácidos nucléicos presentes em seus

núcleos. Em lesões malignas as células apresentam núcleo proporcionalmente maior do que as células normais, corando-se mais intensamente e permitindo sua distinção (NIEBEL; CHOMET, 1964).

Entretanto, o aumento na relação núcleo/citoplasma também pode ser observado em proliferações não malignas, hiperplasia benigna ou inflamações, podendo levar a resultados falsos positivos. Por isso, o uso do azul de toluidina não tem finalidade diagnóstica (DRIEMEL et al., 2007A).

Além do azul de toluidina, outras técnicas auxiliares comerciais podem ser utilizadas para aprimorar a identificação, visualização e monitoramento das lesões orais (MENDES et al., 2011). Dentre elas, pode-se destacar o ViziLite® (Zila Pharmaceuticals, Phoenix, Arizona), um sistema de quimioluminescência, que consiste na emissão de luz a partir de uma reação química entre o peróxido de hidrogênio e o ácido acetilsalicílico dentro de um bastão de luz (RAM, SIAR, 2005). Podem ser utilizados, ainda, sistemas baseados na autofluorescência celular, como o VELscope® (LED Dental Inc. White Rock, British Columbia, Canada) ou na emissão de luz, como o Microlux/DL (AdDent, Danbury, Conn.). Porém, nenhuma dessas técnicas é capaz de diferenciar lesões malignas de lesões benignas (MENDES et al., 2011).

2.1.3.4 Citologia esfoliativa

A citologia esfoliativa consiste na análise microscópica de células coletadas da superfície da mucosa com uma escova e é utilizada principalmente no rastreamento do câncer de colo do útero (DRIEMEL et al., 2007A).

Em se tratando da mucosa oral, a citologia tem se mostrado bastante útil na avaliação de lesões de etiologia desconhecida, como infecções ou traumas e, ainda, na prevenção de diagnósticos incorretos de lesões pré malignas consideradas benignas pela avaliação clínica, podendo ser utilizada também em casos de lesões extensas ou múltiplas ou quando o paciente se recusa a fazer a biópsia (MEHROTRA, 2011).

Como a citologia esfoliativa tem maior adesão pelos pacientes quando comparada à biópsia, por ser uma técnica não invasiva e indolor, este procedimento pode alcançar um número maior de avaliações de lesões suspeitas e aumentar a taxa de tumores curáveis pela detecção em estádios iniciais (BÖCKING et al., 2011).

Contudo, a análise da mucosa oral pela citologia esfoliativa não dispensa o exame histopatológico do tecido obtido pela biópsia e, atualmente, é indicada para avaliar lesões consideradas suspeitas de

malignidade pelo exame clínico e lesões que clinicamente não são suspeitas de malignidade, mas que necessitam de acompanhamento (BÖCKING et al., 2011).

2.1.4 Prognóstico e tratamento

Existem vários fatores prognósticos determinantes na sobrevida e no tratamento dos pacientes com câncer, dentre eles, o mais utilizado é o estadiamento ou classificação TNM (Tabelas 1 e 2), que considera o tamanho ou volume do tumor (T), comprometimento dos linfonodos regionais (N) e ausência ou presença de metástase à distância (M) (BRASIL, 2004). Em geral, o prognóstico piora com o avanço da doença e com o aumento na inacessibilidade do tumor (WARNAKULASURIYA, 2009).

Tabela 1 - Resumo esquemático da classificação clínica TNM.

Classificação	Característica clínica
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	≤ 2 cm
T2	> 2 até 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	<i>Lábio</i> : invasão da cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho bucal ou pele <i>Cavidade oral</i> : invasão da cortical óssea, músculos profundos/ extrínsecos da língua, seios maxilares ou pele
T4b	Invasão do espaço mastigador, lâminas pterigoides, base do crânio ou artéria carótida interna
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Homolateral, único ≤ 3 cm
N2	(a) Homolateral, único, > 3 até 6 cm (b) Homolateral, múltiplo, ≤ 6 cm (c) Bilateral, contralateral, ≤ 6 cm
N3	> 6 cm
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Fonte: adaptado de Brasil (2004).

Tabela 2 – Grupamento da classificação TNM por estádios.

Estádio	Classificação T	Classificação N	Classificação M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	M0
IVB	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: adaptado de Brasil (2004).

O tratamento para pacientes com câncer da cabeça e pescoço pode ser realizado por cirurgia, radioterapia e quimioterapia, isoladas ou em associação (BRASIL, 2002). Enquanto estádios iniciais são geralmente tratáveis pela monoterapia, que acarreta uma leve redução na qualidade de vida, estádios avançados da doença exigem tratamentos mais longos, multimodais e mais agressivos, apresentando um impacto significativo na vida dos pacientes (DRIEMEL et al., 2007A).

Para a maioria dos países, a taxa de sobrevida média em cinco anos para pacientes com câncer da cavidade oral é de aproximadamente 50% e, em geral, as mulheres apresentam taxas maiores do que os homens (WARNAKULASURIYA, 2009).

Estatísticas norte americanas demonstram que a sobrevida em cinco anos para pacientes com câncer de boca pode variar de 82,7% para pacientes em estágio I até 37,3% para pacientes com tumores metastáticos (SEER, 2014).

Além disso, outros fatores também podem ser associados ao prognóstico, como características histopatológicas da lesão (por exemplo, resposta linfocitária, invasão profunda e propagação nodal), condições do paciente (como comorbidades, imunidade e estado nutricional), idade, período em que se fez uso de tabaco e álcool e presença ou ausência do HPV (ANG et al., 2010; GENDEN et al., 2010).

2.1.5 Câncer de boca e HPV

A epidemiologia do CCECP tem mudado drasticamente ao longo dos anos, uma vez que a incidência dos tumores associados ao HPV tem aumentado, enquanto tumores associados ao álcool e tabaco têm diminuído (CHATURVEDI et al., 2008).

Um estudo realizado na Suécia a partir de amostras de tecidos obtidos por biópsia e embebidos em parafina e analisadas pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) observou um aumento da associação do HPV em casos de câncer nas tonsilas de 23% em 1970 para 68% nos anos de 2000 a 2002; 77% de 2003 a 2005 e 93% de 2006 a 2007 (NÄSMAN et al., 2009). Nos EUA, os casos de câncer da orofaringe HPV positivos aumentaram de 16% entre 1984 a 1989 para quase 72% no período de 2000 a 2004 (CHATURVEDI et al., 2011). Estas mudanças não parecem ser relacionadas à integridade das amostras, mas parecem refletir uma mudança na etiologia da doença (RAMSHANKAR, KRISHNAMURTHY, 2013).

Na meta análise realizada por Termine et al. (2008) que incluiu 62 estudos contendo um total de 4.852 amostras de CCECP e envolvendo pacientes da América, Europa, Ásia e África, a prevalência média do HPV foi de 34,5%, sendo maior nos estudos de carcinomas de células escamosas da cavidade oral (CCEO) do que nos estudos de regiões não específicas da cabeça e pescoço (média de 38,1% e 24,1%, respectivamente). Estes resultados são compatíveis com uma meta análise mais recente, realizada por Dayyani et al. (2010) que incluiu 34 estudos contendo no total 5.681 pacientes e registrou uma prevalência média de 22% de CCECP associados ao HPV.

O envolvimento do HPV no CCECP foi proposto pela primeira vez em 1983, por Syrjänen et al., o que foi sustentado por vários outros autores com bases nas similaridades morfológicas entre os epitélios genital e orofaríngeo, o amplo tropismo epitelial do HPV, a detecção de genótipos de HPVs de alto risco em amostras de CCEO e a imortalização *in vitro* de queratinócitos da cavidade oral humana induzida pelo HPV (VENUTI, PAOLINI, 2012).

Atualmente, tem se dividido os CCECP em duas classes de tumores de acordo com o *status* do HPV, que apresentam características moleculares, clínicas e patológicas diferentes. Enquanto os CCECP HPV negativos envolvem pacientes com longa exposição ao tabaco e/ou álcool, os CCECP HPV positivos se desenvolvem independentemente do consumo destas substâncias. Além disso, os CCECP HPV positivos são mais relacionados ao comportamento sexual de risco, envolvem

pacientes mais jovens (menores de 45 anos) e tem desfechos clínicos mais favoráveis do que os pacientes com tumores HPV negativos (ANG et al., 2010; DESCHLER et al., 2014; FAKHRY et al., 2008; GILLISON et al., 2008; HECK et al., 2010).

Estudos indicam que pacientes com câncer da cabeça e pescoço associado ao HPV apresentam melhores respostas à quimioterapia e radioterapia, além de maior sobrevida, menor risco de morte e de recorrência da doença quando comparados aos pacientes com tumores negativos para o vírus (ANG et al., 2010; FAKHRY et al., 2008; RAGIN, TAIOLI, 2007; VIDAL, GILLISON, 2008).

Um estudo conduzido por Fakhry et al. (2008) observou que pacientes com tumores HPV positivos apresentaram melhores taxas de resposta ao tratamento por quimioterapia do que pacientes com tumores HPV negativos (84% e 57%, respectivamente), maiores taxas de sobrevida em dois anos (95% e 62%, respectivamente) e maiores taxas de sobrevida livre da doença em dois anos (86% e 53%, respectivamente). Estes resultados são compatíveis com um estudo mais recente de Ang et al. (2010) em que as taxas de sobrevida em três anos para pacientes com tumores HPV positivos foi de 82,4% enquanto para HPV negativos foi de 57,1%. Neste mesmo estudo, a sobrevida livre de doença em três anos foi de 73,7% e 43,4% e a redução do risco de morte foi de 58% e 51%, para cada grupo respectivamente. Supõe-se, portanto, que a infecção pelo HPV tenha um valor prognóstico importante, podendo ser determinante na escolha do tratamento de cada grupo de pacientes (TAKES et al., 2010).

Em níveis moleculares, os tumores HPV positivos apresentam um tipo selvagem da p53 e níveis elevados da p16, enquanto tumores HPV negativos apresentam mutações da p53 e baixos níveis de p16 (RAGIN, TAIOLI, 2007). Com isso, a expressão da p16 pode ser utilizada como marcador molecular da infecção pelo HPV servindo como indicador de prognóstico e tratamento para os pacientes com CCECP (DAHLSTRAND et al., 2005; SMITH et al., 2008).

Uma das possíveis explicações para o melhor prognóstico dos pacientes com CCECP HPV positivos em contraste com os tumores associados ao tabaco é que a presença da p53 funcional pode causar uma susceptibilidade do tumor induzida por apoptose frente à radiação (PELTENBURG, 2000).

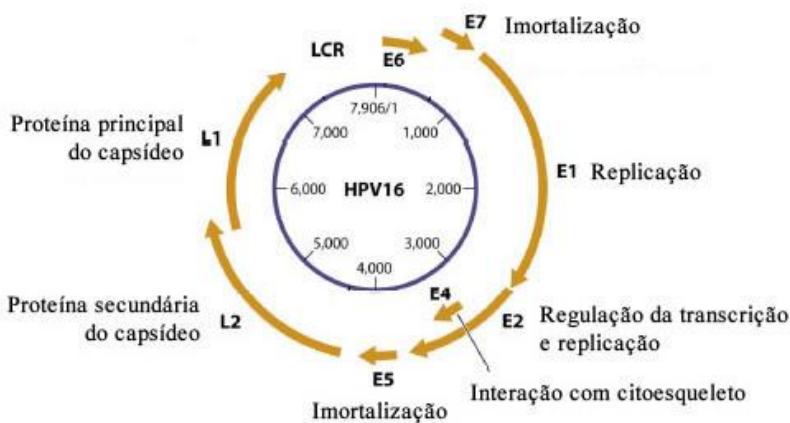
2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

2.2.1 Estrutura do genoma viral do HPV

O HPV é um vírus pequeno, não envelopado, formado por dupla fita de DNA circular com aproximadamente 55 nm de diâmetro e 8000 pares de bases (pb). O DNA viral é associado a histonas na forma de um “minicromossomo” e envolto por um capsídeo icosaédrico (RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

O genoma do HPV, representado esquematicamente na figura 1 pelo genoma do HPV 16, é dividido em três regiões principais, sendo uma região não codificadora também denominada “LCR” (*Long Control Region*), que contém as sequências de DNA fundamentais para regular a replicação e transcrição viral tanto através dos genes virais quanto dos genes celulares; e duas regiões codificadoras de proteínas (RAMPIAS et al., 2013; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV 16, incluindo as principais funções dos genes E e L.



Fonte: adaptado de Lazarczyk et al. (2009).

As sequências codificadoras de proteínas, chamadas de Regiões Abertas de Leitura ou ORFs (*Open Reading Frames*) são classificadas de acordo com seu momento de expressão no ciclo de vida celular do vírus em precoce ou “E” (*Early*), e tardia ou “L” (*Late*) e são restritas a

uma das fitas do DNA viral (BEST et al., 2012; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

A região “E”, composta por 4000 pb, contém os genes precoces que codificam até 8 proteínas não estruturais: E1 e E2 responsáveis pelo controle da replicação do DNA episomal e da transcrição viral, respectivamente; E4 envolvida na maturação e liberação das partículas virais e interação com o citoesqueleto, dando início à formação dos coilócitos nas células epiteliais; E5 envolvida na inibição da apoptose e no estabelecimento da infecção persistente e E6 e E7, consideradas oncoproteínas, responsáveis pela progressão do ciclo celular e da replicação do DNA viral. As proteínas E3 e E8 foram descritas recentemente em alguns tipos de HPV, porém suas funções permanecem desconhecidas (ALBA et al., 2009; KIVI et al., 2008; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012; RAMPIAS et al., 2013).

A região “L”, com 3000 pb, é responsável por codificar as proteínas estruturais constitutivas do capsídeo viral, L1 e L2 (RAMPIAS et al., 2013; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012). Este capsídeo é composto por 360 cópias da proteína L1, que possui peso molecular de 54 a 458 kDa e representa aproximadamente 90% da partícula viral, organizadas em 72 capsômeros ou pentâmeros, dispostos de forma icosaédrica. Enquanto isso, a proteína secundária L2, de peso molecular entre 68 a 76 kDa, fica localizada nos vértices do capsídeo (BAKER et al., 1991; FAVRE et al., 1997; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

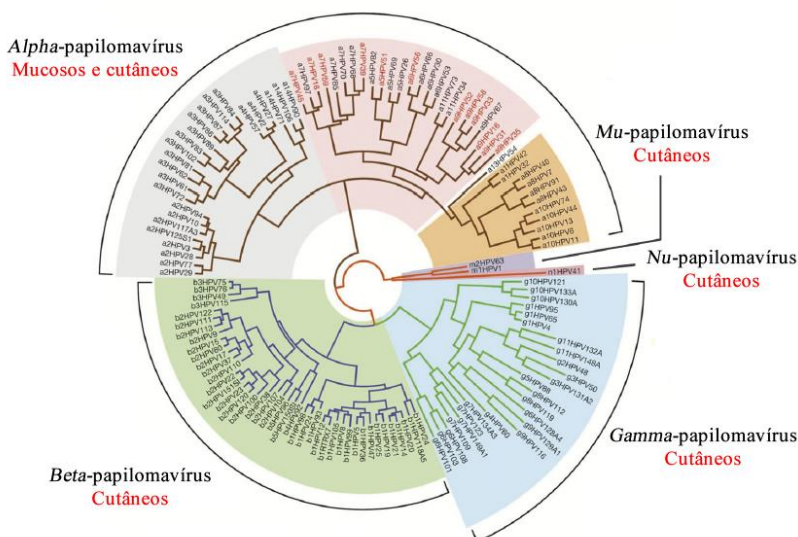
As ORFs E1, E2, L1 e L2 são as sequências de DNA mais conservadas entre todos os tipos de HPVs (VILLIERS et al., 2004).

2.2.2 Classificação do HPV

De acordo com o *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) o HPV pertence à família *Papillomaviridae* e sua taxonomia é baseada na sequência de nucleotídeos da região genômica mais conservada, a ORF L1, dividindo-se em gêneros, espécies, tipos, subtipos e variantes. Gêneros diferentes são aqueles que compartilham menos de 60% de similaridade na sequência de nucleotídeos da ORF L1. Dentro de um gênero, define-se uma nova espécie de HPV quando a variação nucleotídica é maior que 30% e um novo tipo quando a variação é maior que 10%. Novos subtipos e variantes são definidos por diferenças maiores que 2 até 10% e menores que 2%, respectivamente (de VILLIERS et al., 2004).

Os HPVs pertencem a cinco dos 16 gêneros dos Papillomavirus (PVs): *Alpha*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu* (Figura 2), dentre os quais, o gênero *Alpha* é o mais estudado e o mais relevante clinicamente por compreender os HPVs de alto risco mais prevalentes na população em geral, capazes de infectar as mucosas genital e orofaríngea, e associados ao câncer cervical (de VILLIERS et al., 2004; DOORBAR et al., 2012; SCHIFFMAN et al., 2010).

Figura 2 - Relação evolucionária entre os tipos de HPVs.



Fonte: adaptado de Doorbar et al. (2012).

A imagem mostra a árvore filogenética de máxima verossimilhança para os genes E1, E2, L2 e L1 de 132 tipos de HPVs. Os HPVs compõem cinco grupos evolutivos com diferentes tropismos epiteliais e associações a doenças. O gênero *Alpha* inclui os tipos mucosotrópicos de baixo risco (muitos contidos na área laranja) que causam verrugas genitais e mucosotrópicos de alto risco (contidos na área rosa) que podem causar neoplasias cervicais e câncer. Embora os HPVs cutâneos, a maioria contida nas áreas cinza (*Alpha*), verde (*Beta*) e azul (*Gamma*), não sejam geralmente associados ao câncer, alguns tipos *Beta* têm sido associados ao câncer de pele não melanoma em indivíduos imunodeprimidos e em pacientes com epidermodisplasia verruciforme.

Os papilomavírus humanos são denominados pela sigla HPV seguida por um número, à sequência que um novo tipo é descoberto (de

VILLIERS et al., 2004) e podem ser classificados de acordo com seu tropismo ou potencial oncogênico.

Os tipos de HPVs que possuem tropismo por células cutâneas são denominados cutaneotrópicos (HPVs 1, 4, 5, 8, 41, 48, 60, 63 e 65) e são frequentemente isolados em verrugas cutâneas e plantares, nas lesões cutâneas de pacientes com epidermodisplasia verruciforme e imunodeprimidos após transplante e em alguns tumores epiteliais. Os HPVs mucosotrópicos são aqueles que possuem tropismo por células mucosas (HPVs 6, 11, 13, 44, 55, 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67, 18, 39, 45, 59, 68, 70, 26, 51, 69, 30, 53, 56, 66, 32, 42, 34, 64, 73, 54) e são identificados em lesões benignas e malignas do trato anogenital de homens e mulheres. Estes tipos virais também são isolados em tecidos e lesões da cavidade oral, orofaringe, laringe e esôfago (CASTELLSAGUÉ, 2008).

Os HPVs associados às infecções em mucosas são classificados clinicamente em alto risco e baixo risco de acordo com o potencial de malignidade das lesões que causam (HUH et al., 2007). Dentre o gênero *Alpha*, 12 tipos de HPVs são classificados como de alto risco (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59), 6 tipos como risco provável (HPV 26, 53, 66, 68, 73, 82) e outros 12 tipos como HPVs de baixo risco (HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 61, 72, 81, 89) (CLIFFORD et al., 2003; MUÑOZ et al., 2006).

2.2.3 História natural da infecção pelo HPV e a carcinogênese oral

As infecções pelo HPV representam as infecções sexuais mais comuns em todo o mundo e estima-se que mais de 80% das mulheres sexualmente ativas poderão ser infectadas em algum momento de suas vidas (ZARAVINOS, 2014).

A principal via de transmissão do HPV é o contato direto da pele ou mucosa e, apesar da relação sexual ser um meio de transmissão importante, não é essencial para a infecção genital. Além desta, a transmissão vertical, da mãe para o feto, é uma rota comum e mais de 80% das crianças nascidas de mães com infecção genital pelo HPV são positivas para o DNA do HPV na região da nasofaringe e mucosa oral (MARTÍNEZ, TROCONIS, 2014).

Contudo, a infecção pelo HPV em regiões da cabeça e pescoço, assim como no colo uterino, é geralmente associada ao comportamento sexual de risco, em especial ao número de parceiros e ao sexo oral, e a tipos de HPV de alto risco, principalmente ao HPV 16, presente em

muitos casos de câncer de boca e orofaringe (D'SOUZA et al., 2014; HECK et al., 2010).

A partir da penetração do vírus no epitélio a infecção pode se estabelecer na forma latente, sem crescimento ou evidência microscópica da presença do vírus; subclínica, com manifestações clínicas discretas somente possíveis de visualização com o auxílio de equipamentos; ou clínica, em que existe a presença visível de lesões (PASSOS et al., 2008). A grande maioria destas infecções (80 a 90%) é assintomática e apresenta regressão espontânea em 24 meses, embora este tempo dependa do tipo de HPV e do estado imunológico de cada paciente, não persistindo por tempo suficiente para desregular a expressão gênica nas células do hospedeiro (DOORBAR et al., 2012; ZARAVINOS, 2014).

A prevalência do HPV varia com a localização anatômica, indicando que para a mesma exposição sexual a susceptibilidade à infecção é diferente para cada epitélio. Além disso, a infecção pelo HPV é significativamente variável com o gênero, o que pode explicar as diferenças nas taxas de incidência do câncer em alguns casos (GIULIANO et al., 2014).

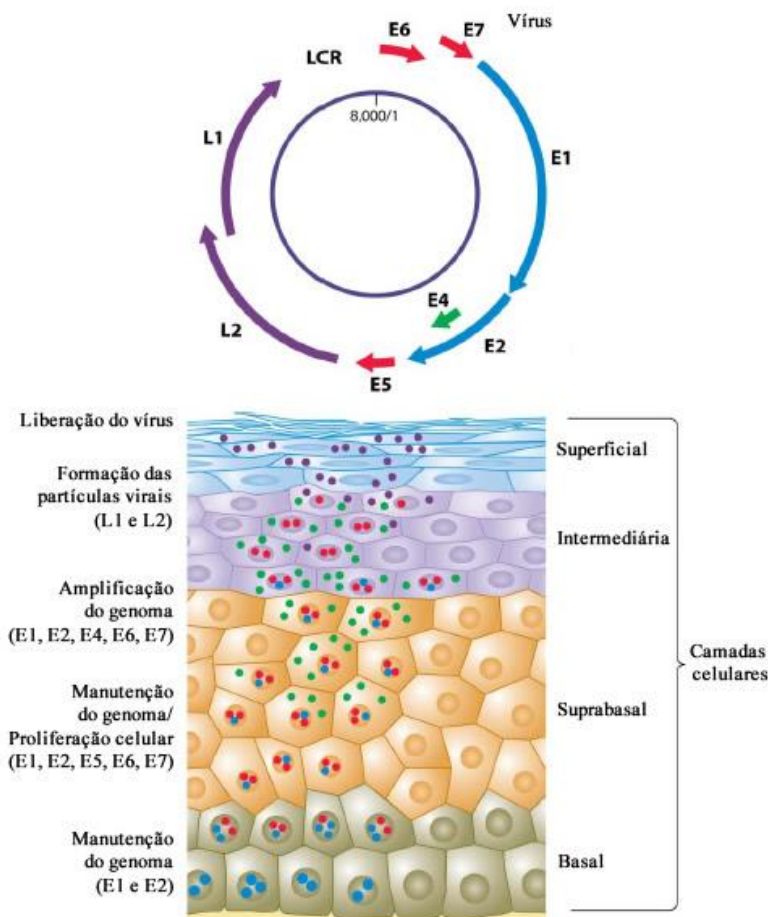
Em um estudo completo de base populacional realizado recentemente nos EUA, por exemplo, o padrão específico da idade de prevalência de HPV oral foi semelhante entre homens e mulheres, com as maiores taxas observadas em indivíduos com idades de 30 a 34 anos e de 60 a 64 anos. Porém, a prevalência absoluta do HPV oral em homens foi consideravelmente maior do que em mulheres (10,1% e 3,6%, respectivamente) (GILLISON et al., 2012). Em outro estudo, também realizado em pacientes dos EUA, a prevalência do HPV 16 e a incidência do CCEO foram de 5 a 7 vezes maiores em homens do que em mulheres (D'SOUZA et al., 2014).

A razão para esta variação ainda não é bem estabelecida, mas supõe-se que a mucosa genital feminina tenha uma carga viral maior do que o epitélio queratinizado dos genitais masculinos e, com isso, a transmissão pelo sexo oral realizado em mulheres seja mais eficiente do que a transmissão pelo sexo oral realizado homens. Além disso, os homens teriam mais oportunidades de exposição ao vírus, uma vez que costumam ter mais parceiros sexuais durante a vida. Alguns estudos indicam, ainda, que as mulheres podem apresentar certo nível de imunidade ao HPV devido às infecções cervicais, o que pode protegê-las contra a infecção oral, enquanto esta proteção não é observada nos homens (D'SOUZA et al., 2014; GIULIANO et al., 2014; LU et al., 2012; SAFAEIAN et al., 2010).

2.2.4 Ciclo de vida do HPV

O ciclo de vida do HPV (Figura 3) é fortemente ligado à diferenciação do epitélio do hospedeiro, pois como o genoma do HPV não codifica enzimas necessárias para a replicação viral, o vírus depende das proteínas de replicação celular do hospedeiro como mediadores da síntese do DNA viral (MOODY, LAIMINS, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida do HPV e expressão das proteínas E e L nas diferentes camadas celulares após a infecção.



Fonte: adaptado de Lazarczyk et al. (2009).

A infecção pelo HPV inicia-se quando partículas virais entram nas células indiferenciadas da camada basal do epitélio escamoso estratificado, expostas por traumas ou micro lesões. Embora o exato receptor para a entrada do vírus nas células ainda não tenha sido elucidado, estudos indicam que ela seja dependente de sulfato de heparina (GIROGLOU et al., 2001; MOODY, LAIMINS, 2010; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

Nas células basais em proliferação, o genoma do HPV se estabelece na forma de elementos extracromossomais ou epissomas e, inicialmente, se mantém entre 50 e 100 cópias por célula. As proteínas E1 e E2 são expressas e regulam a replicação dos epissomas e expressão de outros genes virais precoces, fazendo com que o vírus se replique de forma coordenada com a replicação do DNA celular (FRATTINI, LAIMINS, 1994; LAZARCZYK et al., 2009; MOODY, LAIMINS, 2010; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

Na divisão celular o DNA viral é distribuído entre duas células filhas, sendo que uma delas inicia o processo de diferenciação e maturação e a outra permanece indiferenciada na camada basal, servindo como reservatório do genoma viral (DOORBAR, 2005; SCHEURER et al., 2005).

Conforme as células infectadas se diferenciam e migram para as camadas superficiais do epitélio, os oncogenes E6 e E7 são expressos e modificam o ciclo celular do hospedeiro de forma a conter a diferenciação celular em um estado favorável para a amplificação do genoma viral (BEST et al., 2012).

A amplificação ocorre na camada suprabasal e trata-se da fase produtiva da infecção pelo HPV, caracterizando-se pela replicação do DNA viral no estado vegetativo. Neste estágio, as proteínas E4 e E5 são expressas e atuam em conjunto com as proteínas E1 e E2. O genoma é amplificado a mais de 1.000 cópias por célula e leva a expressão dos genes tardios L1 e L2 (HONG, LAIMINS, 2013; LAZARCZYK et al., 2009; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

A proteína L1 forma espontaneamente pentâmeros que se unem a L2 para formar o capsídeo e encapsulam os novos genomas virais sintetizados, formando as partículas virais maduras. Estas proteínas de capsídeo são ligadas por pontes de dissulfeto que promovem estabilidade e proteção contra agressões ambientais quando o vírus é eliminado da superfície epitelial. A proteína L2 é altamente conservada entre os tipos virais e é exposta durante a ligação com o receptor de superfície celular na infecção inicial, completando o ciclo de vida viral (BEST et al., 2012; BUCK et al., 2005). Então, o vírus deve sair da

célula infectada e sobreviver extracelularmente antes da reinfecção (DOORBAR, 2005). A proteína E4 contribui com a liberação do vírus da célula por romper a estrutura da queratina, comprometendo a integridade celular (McINTOSH et al., 2008; WANG et al., 2004).

2.2.5. Mecanismos moleculares da carcinogênese do HPV

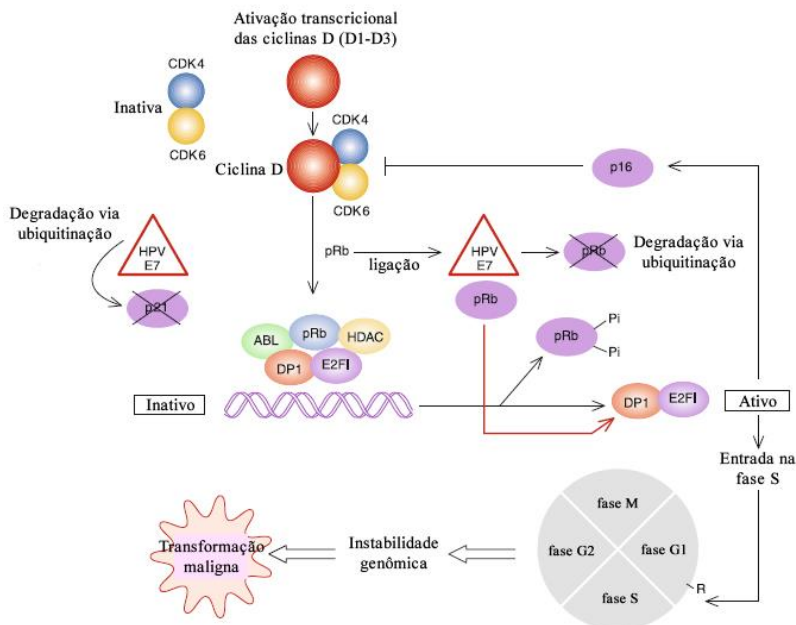
Nas lesões produtivas causadas pelo HPV o genoma viral permanece na forma episomal, independentemente do tipo viral, resultando em lesões benignas. Porém, em infecções persistentes por HPVs de alto risco as sequências do DNA viral se integram ao genoma do hospedeiro, caracterizando uma infecção não produtiva (DOORBAR, 2007; PASSOS et al., 2008). Nos carcinomas associados ao HPV o vírus pode ser encontrado nas formas episomal, integrada ou uma combinação de ambas (RAMPIAS et al., 2013).

Na integração do DNA do HPV ocorre uma redução significativa na expressão dos genes E1 e E2, reguladores da replicação e transcrição viral. Como a expressão da proteína E2 inibe a transcrição dos oncogenes E6 e E7, sua perda conduz a uma desregulação na expressão destes genes favorecendo a carcinogênese (FERTEY et al., 2011; MÜNGER et al., 2004).

O potencial oncogênico do HPV é atribuído principalmente às proteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco, uma vez que estudos demonstram que nos HPVs de baixo risco estas proteínas não possuem capacidade de atuar na transformação e imortalização celular (PIM, BANKS, 2010). E6 e E7 interagem com uma variedade de proteínas celulares inibindo a apoptose e estimulando a progressão descontrolada do ciclo celular (HAEDICKE, IFTNER, 2013). Além delas, tem sido relatado que a E5 de HPVs de alto risco também contribui com a proliferação maligna, porém o mecanismo molecular exato para esta ação não está completamente elucidado (KIVI et al., 2008).

O principal mecanismo da transformação maligna ocasionada pela E7 é sua interação com os membros da família do retinoblastoma (Rb), em particular, a proteína supressora tumoral do retinoblastoma (pRb) (Figura 4) (MOODY, LAIMINS, 2010).

Figura 4 - Representação esquemática da transformação maligna causada pela oncoproteína E7 do HPV.



Fonte: Adaptado de Rautava, Syrjänen (2012).

A família Rb é responsável pelo controle da transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (ponto R da figura). Nas células não infectadas, a pRb hipofosforilada liga-se diretamente ao fator de transcrição E2F, reprimindo a transcrição de promotores do ciclo celular E2F dependentes. Na fase G1 tardia, a pRb é fosforilada mediante a ação do complexo ciclina/quinase ciclina dependente (ciclina/CDK) o que resulta na dissociação do E2F e leva a transcrição dos fatores da fase S e a progressão do ciclo celular. Por sua vez, a p16, membro da classe INK4 de inibidores do ciclo celular, liga-se com as CDKs 4 e 6 bloqueando a interação com a ciclina D e mantendo a pRb num estado hipofosforilado capaz de se ligar ao E2F e bloquear a progressão do ciclo celular (RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

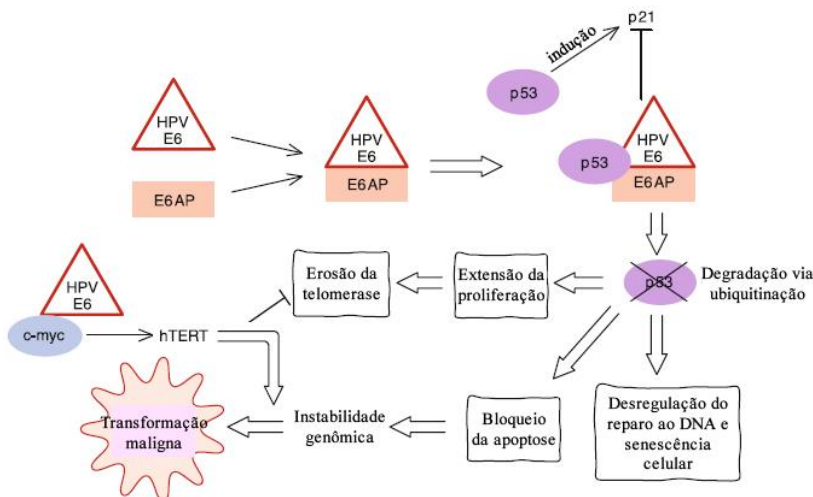
A oncoproteína E7 de HPVs de alto risco age de forma análoga a fosforilação mediada pelo complexo ciclina/CDK, ligando-se à pRb e interrompendo sua interação com o E2F, o que resulta na expressão constitutiva dos genes E2F responsivos e na transição para a fase S do

ciclo celular. Consequentemente, ocorre a superexpressão compensatória da p16 (RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

Além da inativação funcional da pRb, a E7 interrompe a ação das p21 e p27, inibidoras de CDKs e conduz a degradação proteossomal da pRb e outros membros da família Rb via ubiquitina dependente, comprometendo outras atividades da família, como reparo do DNA e manutenção da integridade genômica (MOODY, LAIMINS, 2010; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012)

Uma das principais consequências da ação da E7 sobre a família Rb seria o aumento dos níveis da proteína supressora tumoral p53. Frente a dano ao DNA ou estresse celular, a p53 mediada pela p21, bloqueia o ciclo celular na fase G1 pela inibição das CDKs ou ativa o mecanismo de apoptose através da ativação do gene bax (MOODY, LAIMINS, 2010; ZARAVINOS, 2014). Porém, a proteína E6 do HPV, em associação com a E6 ubiquitina ligase (E6AP) leva à degradação proteossomal da p53 (Figura 5), comprometendo o controle do ciclo celular e a apoptose (RAMPIAS et al., 2013).

Figura 5 - Representação esquemática da transformação maligna causada pela oncoproteína E6 do HPV.



Fonte: adaptado de Rautava, Syrjänen (2012).

Além disso, a proteína E6 interage com myc ativando a transcrição da telomerase transcriptase reversa (TERT) que estimula a expressão da telomerase, uma enzima importante para a replicação dos

telômeros, que tratam-se de sequências de DNA localizadas nas extremidades dos cromossomos que conferem estabilidade genômica, levando à imortalização celular (RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012).

2.2.6 Métodos de detecção do HPV em câncer de cabeça e pescoço

Embora o manejo do CCECP não necessite da avaliação da presença do HPV, este procedimento tem se demonstrado importante no cuidado aos pacientes, uma vez que a associação ao HPV pode acarretar em grande impacto no tratamento e prognóstico dos pacientes (VENUTI, PAOLINI, 2012; ZARAVINOS, 2014).

Atualmente, não existe um consenso sobre o método mais adequado para esta análise (WESTRA, 2014). Com isso, a utilização de técnicas diversas tem resultado em taxas de prevalência de HPV totalmente discrepantes, variando de 0% a 100% (CASTRO, BUSSOLOTI FILHO, 2006; KOYAMA et al., 2007; KOUVOUSI et al., 2013; LIANG et al., 2008; NÄSMAN et al., 2009; RIVERO, NUNES, 2006; TERMINE et al., 2008).

Além de fatores inerentes aos métodos, a variação na detecção do HPV pode ser ocasionada pela quantidade de amostras, localização das lesões, abrangência do painel de tipos de HPV pesquisados e por fatores associados às amostras e ao grupo de pacientes (GIULIANO et al., 2014; MIGALDI et al., 2012; SYRJÄNEN, 2010).

Dentre as amostras utilizadas, destacam-se as amostras de tecidos, obtidas por biópsia. Também podem ser usadas amostras citológicas, obtidas por esfoliação ou enxaguados bucais, e de saliva, porém, estudos com estes dois tipos apresentaram baixas sensibilidade e especificidade (SMITH et al., 2004; ZHAO et al., 2005). As amostras podem ser, ainda, frescas, congeladas ou fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFEP), sendo que as taxas de detecção são geralmente maiores quando são usadas amostras congeladas em comparação a amostras fixadas em formalina (LAJER, von BUCHWALD, 2010; MIGALDI et al., 2012; SYRJÄNEN, 2010).

Em relação ao grupo de pacientes, fatores como gênero, idade e exposição a fatores de risco (uso de tabaco e álcool) e o comportamento sexual, além da região geográfica e do desenvolvimento econômico podem influenciar não apenas na prevalência do HPV, mas também nas taxas de infecção por diferentes tipos do vírus (GIULIANO et al., 2014; MIGALDI et al., 2012; SYRJÄNEN, 2010).

A detecção do HPV pela biologia molecular é o padrão ouro na identificação do vírus em amostras de tecidos e de células esfoliadas e

pode ser realizada por diversas técnicas, com diferentes sensibilidades e especificidades (ZARAVINOS et al., 2009). As estratégias podem ter como alvo o DNA ou RNA do HPV, oncoproteínas virais, proteínas celulares ou anticorpos específicos (WESTRA, 2014).

As técnicas utilizadas para a detecção do DNA do HPV podem ser divididas em dois grupos: as técnicas de amplificação de um alvo, que utilizam oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) alvo-específicos a fim de amplificar uma sequência específica de ácidos nucleicos da amostra a um nível que possa ser facilmente detectado; e as técnicas de amplificação de sinal, que são baseadas na hibridização dos ácidos nucleicos da amostra, em meio líquido ou *in situ* nas células ou cortes histológicos, com a utilização de sondas alvo específicas (BRINK et al., 2007).

2.2.6.1 Técnicas de amplificação de um alvo

A PCR é uma reação na qual uma sequência de DNA alvo é amplificada exponencialmente durante ciclos repetitivos, produzindo milhões de cópias desta sequência (VENUTI, PAOLINI, 2012). Os ciclos da PCR são compostos por etapas de diferentes temperaturas a fim de realizar a desnaturação, pareamento e extensão do DNA marcado utilizando-se uma DNA polimerase termoestável (SNIJDERS et al., 2010).

Trata-se de um método de alta sensibilidade, amplamente disponível e custo efetivo para a detecção do HPV. Teoricamente, esta técnica é capaz de detectar tão pouco quanto apenas uma cópia da sequência de DNA viral e pode ser utilizada para uma ampla variedade de amostras, como células esfoliadas, tecidos frescos, congelados e FFEP (VENUTI, PAOLINI, 2012; WESTRA, 2014). A partir da amplificação do DNA, outros métodos para identificação dos tipos virais podem ser empregados (ALBA et al., 2009).

Existem duas formas fundamentais para a detecção do HPV pela PCR. A mais frequentemente utilizada amplifica uma região comum a múltiplos tipos de HPVs com a utilização de *primers* chamados “consenso” e que tem como alvo uma sequência altamente conservada do seu genoma (ALBA et al., 2009). A PCR específica é baseada no desenho de *primers* específicos para cada tipo, subtipo ou variante viral do HPV, com especificidade próxima a 100% (ALBA et al., 2009).

Pode ser utilizada ainda, a *nested* PCR, que consiste em uma PCR de duas etapas, sendo que a segunda reação é realizada utilizando o produto de uma PCR convencional como amostra, e *primers* que tem

como alvo uma sequência interna à primeira sequência de DNA amplificada. Esta técnica é particularmente útil para amostras com baixa carga viral ou com baixa qualidade de DNA extraído (BOUGUSIAK, KOBOS, 2014).

Embora o DNA seja o alvo amplificável na PCR, o RNA mensageiro (mRNA) também pode ser amplificado. Para isso é realizada, previamente, uma reação de transcrição reversa, mediada por uma transcriptase reversa (RT), gerando uma cadeia de DNA complementar (cDNA) (SNIJDERS et al., 2010).

2.2.6.2 Técnicas de amplificação de sinal

A técnica mais conhecida na categoria de amplificação de sinal é a Captura Híbrida 2 (HC2) (Qiagen, Gaithersburg, MD), aprovada pela *United States Food and Drug Administration* (FDA) e considerada método de referência para a detecção do HPV em amostras cervicais (EMMADI et al., 2011; SNIJDERS et al., 2010). Nesta técnica, sondas de RNA formam híbridos com o DNA viral em solução. Estes híbridos são capturados por um sistema de anticorpos específicos, marcados e adsorvidos sobre uma placa, liberando um sinal quimioluminescente (BHATLA et al., 2012).

Na HC2 é utilizada uma mistura de sondas capazes de detectar 13 tipos de HPVs de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e cinco tipos de HPVs de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44) (CLAVEL et al., 1998). Entretanto, as principais desvantagens desta técnica são a baixa sensibilidade, necessitando de aproximadamente 10^5 cópias do genoma do HPV, e a impossibilidade de distinguir o tipo viral e a presença de infecções múltiplas (ALBA et al., 2009; SNIJDERS et al., 2010).

Mais recentemente, a FDA aprovou a Cervista HPV HR (Hologic, Inc., Bedford, MA), outro método comercial de hibridização capaz de detectar 14 tipos de HPVs de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68) e de identificar polimorfismos de um único nucleotídeo tipo específico, reduzindo de forma eficaz possíveis reações cruzadas com HPVs de baixo risco e resultados falsos positivos (EMMADI et al., 2011). Porém, tanto a HC2 quanto a Cervista foram desenvolvidas especificamente para a detecção do HPV em amostras de raspados cervicais (SNIJDERS et al., 2010).

Ainda assim, um estudo conduzido por Smith et al. (2014) mostrou que a HC2 é um método confiável para a determinação do *status* do HPV em casos de CCECP em que existe metástase linfonodal,

utilizando amostras citológicas obtidas por punção aspirativa por agulha fina. Porém, neste estudo foi determinado que devem existir, no mínimo, 30 mil cópias do DNA viral na amostra para a possível detecção do HPV. Com isso, a limitação mais importante da HC2 nestes casos é que como nesta reação não é feita uma amplificação do DNA do HPV pode ocorrer um grande número de resultados falsos negativos em amostras com baixa carga viral.

Além da hibridização em meio líquido, técnicas de hibridização *in situ* (ISH) têm sido elaboradas para a detecção do DNA do HPV. A ISH é o único método molecular que permite a detecção e a identificação confiável do HPV em relação topográfica com suas lesões, pois todo o procedimento de detecção ocorre dentro do núcleo da célula infectada e não sobre suportes sólidos ou soluções (VENUTI, PAOLINI, 2012).

A ISH apresenta como vantagem a capacidade de identificação das lesões clinicamente significativas pela avaliação do estado físico do vírus, sendo que precipitados pontuais nos núcleos correspondem ao vírus integrado e sinais difusos correspondem à sua forma episomal (VENUTI, PAOLINI, 2012). Nesta técnica também são utilizadas sondas específicas marcadas e o resultado da reação é avaliado microscopicamente pela deposição de um substrato colorido ou por fluorescência, ou seja, a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (VENUTI, PAOLINI, 2012).

O uso da FISH permite a detecção simultânea de vários alvos a partir da utilização de fluorocromos de cores diferentes e tem sido utilizada na detecção do DNA do HPV em associação a outros marcadores moleculares da carcinogênese induzida pelo HPV (OBERMANN et al., 2013).

Contudo, uma meta análise realizada por Termine et al. (2008) verificou que estudos que utilizam a PCR como método de detecção de HPV em amostras de CCEO alcançam taxas de prevalência de HPV maiores do que estudos conduzidos por ISH (39,9% e 29,85%, respectivamente). Além disso, a *nested* PCR apresenta maior sensibilidade em comparação à PCR convencional (FUESSEL HAWS et al., 2004; WINDER et al., 2009).

3 JUSTIFICATIVA

Os HPVs de alto risco contribuem significativamente para o desenvolvimento dos tumores associados a infecções virais, sendo responsáveis por aproximadamente 600 mil casos anuais de câncer (MOORE, CHANG, 2010) e, em média, de 20% a 40% dos carcinomas da cabeça e pescoço, dependendo da localização anatômica (DAYYANI et al., 2010; TERMINE et al., 2008).

Estudos recentes demonstram que a avaliação da presença do HPV tem grande relevância clínica nos casos de CCECP, uma vez que a infecção pelo vírus pode acarretar em implicações no tratamento e prognóstico dos pacientes (ANG et al., 2010; FAKHRY et al., 2008; GILLISON et al., 2008; VIDAL, GILLISON, 2008). Porém, ainda não existe um consenso sobre o método mais adequado para a detecção do HPV em amostras de CCEO (WESTRA, 2014).

Para serem implementados na área clínica, os métodos de detecção devem ser precisos, custo efetivos e rapidamente transferíveis para a rotina do diagnóstico laboratorial (WESTRA et al., 2014). A PCR atende a esses requisitos e é uma técnica altamente sensível que pode ser utilizada para uma ampla variedade de amostras, incluindo as FFEP (VENUTI, PAOLINI, 2012; WESTRA, 2014). Dentre os *primers* mais utilizados para a detecção do DNA do HPV por PCR pode-se destacar os GP5/6 e sua versão estendida GP5+/6+ (de RODA HUSMAN et al., 1995), MY09/11 (MANOS et al., 1989) e PGMY09/11 (GRAVITT et al., 2000) que amplificam uma sequência de DNA conservada da região L1 do genoma viral.

O Brasil está entre os três países de maior incidência do câncer da cavidade oral, contudo, existem poucos estudos no país a respeito da prevalência do HPV nestes tumores e, assim como no âmbito global, seus resultados são discordantes, variando de 0 a 39% (ANCELA et al., 2010; MAZON et al., 2011; MIYAHARA et al., 2011; RIVERO , NUNES, 2006).

O Ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) atua como centro de referência na atenção do diagnóstico bucal, atendendo com exclusividade à pacientes do Sistema Único de Saúde (SUS) do Estado de Santa Catarina, que apresentam lesões orais de diversas etiologias.

Com isso, este estudo tem o propósito de avaliar a utilização de diferentes *primers* para a detecção do DNA do HPV por PCR e verificar a prevalência da infecção pelo HPV nos pacientes com CCEO atendidos no Ambulatório de Estomatologia da UFSC.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização de diferentes *primers* para a detecção do DNA do HPV pela técnica da PCR a partir de amostras de tecido oral FFEP e verificar a prevalência da infecção pelo HPV nos pacientes com CCEO atendidos no Ambulatório de Estomatologia da UFSC.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o uso dos primers GP5+/6+, MY09/11 e PGMY09/11 para a detecção do DNA do HPV em amostras de tecido oral FFEP positivas para CCEO;
- Comparar o uso da PCR convencional com a *nested* PCR para a detecção do DNA do HPV em amostras de tecido oral FFEP positivas para CCEO;
- Verificar a prevalência da infecção pelo HPV nos casos de CCEO em pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia da UFSC;
- Verificar a associação entre os fatores risco para o CCEO e a infecção pelo HPV nos pacientes.

5 MATERIAIS E METODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) em 12 de novembro de 2012, parecer número 144.430 (Anexo A).

5.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Este trabalho trata-se de um estudo descritivo, transversal, com análise qualitativa dos dados obtidos.

5.3 AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram selecionadas amostras de tecido oral FFEP de pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia da UFSC, analisadas e arquivadas pelo Laboratório de Patologia Bucal da mesma universidade (LPB/UFSC) com resultados histopatológicos positivos para CCEO no período de setembro de 2006 a dezembro de 2013.

Foram excluídas as amostras de pacientes com resultados positivos para câncer de lábios e de mucosa labial por se tratarem de lesões geralmente associadas à exposição solar UV (GALLAGHER et al., 2010). Foram excluídas, também, as amostras com material insuficiente para a realização da microtomia a fim de preservar o material de arquivo.

As informações sobre os pacientes foram mantidas em sigilo e as fichas de solicitação de biópsia (fichas clínicas) e laudos histológicos permaneceram armazenados no LPB/UFSC, sob a responsabilidade da profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero.

A partir de cada amostra foram obtidos em média 10 cortes com 10 µm de espessura que foram armazenados em microtubos do tipo Eppendorf e enviados ao Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias da Universidade Federal de Santa Catarina (LBMM/UFSC) para a pesquisa.

5.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

5.4.1 Remoção da parafina

A remoção da parafina foi realizada segundo Rivero et al. (2006). Para a dissolução da parafina foi adicionado 1 mL de xilol pré aquecido a cada amostra que foi homogeneizada em vórtex e mantida sob aquecimento a 56°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Estas etapas foram repetidas até a completa remoção da parafina. Posteriormente, o sedimento foi submetido a etapas de lavagem com etanol absoluto e etanol 70%. Entre cada lavagem as amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a 12000 x g por 5 minutos.

5.4.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada pelo método do acetato de amônio, conforme Neves et al. (2002). Para a lise do tecido, foi adicionado a cada amostra 40 µl de Proteinase K (Qiagen-USA) e 180 µl de tampão ATL (Qiagen-USA). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e mantidas em agitador térmico a 56° C por 72 horas, acrescentando-se 20 µl de Proteinase K a cada 24 horas. Após este período as amostras foram submetidas a um choque térmico a 90° C por uma hora. Então, foram adicionados 200 µl de acetato de amônio 4 M a cada amostra que, em seguida, foi agitada em vórtex, incubada em banho de gelo por 5 minutos e centrifugada a 12000 x g por 5 minutos.

O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo em que foram adicionados 600 µl de isopropanol. As amostras foram homogeneizadas por inversão e novamente centrifugadas a 12000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 70% ao sedimento de DNA, que foi mais uma vez homogeneizado por inversão e centrifugado a 12000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo o sedimento foram incubados abertos a 60° C até a evaporação total do etanol.

Finalmente, o DNA foi ressuspensionado em 50 µl de solução Tris-EDTA (TE) (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 e EDTA 1 mM, pH 8) e armazenado a -20°C até o momento da análise.

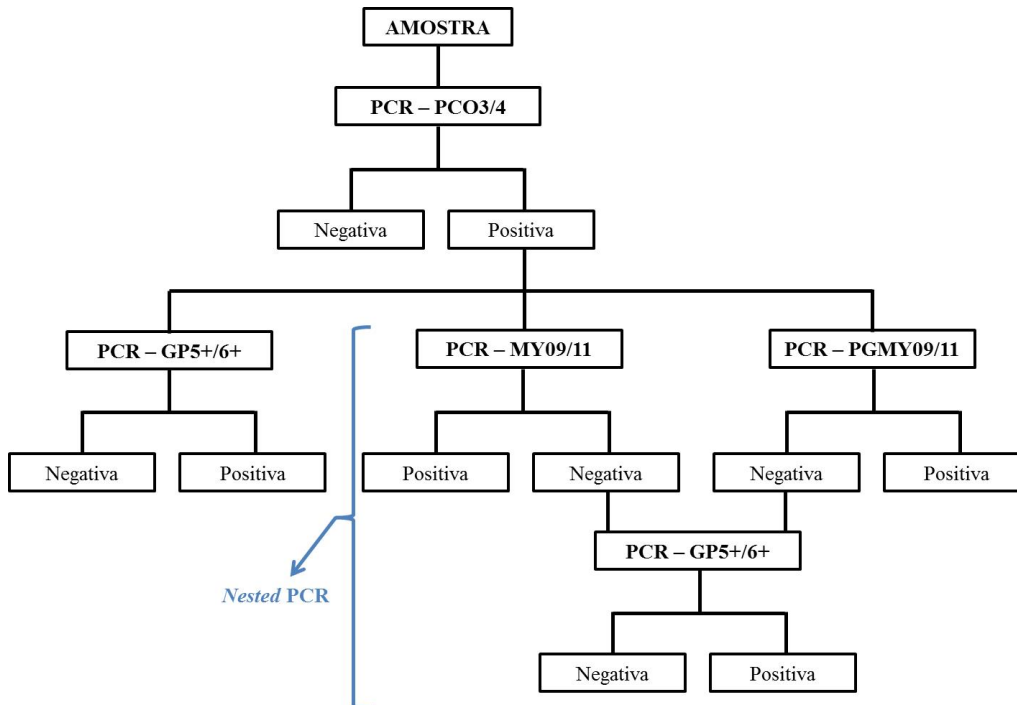
5.4.3 Quantificação e pureza do DNA extraído

A concentração e pureza do DNA extraído das amostras foram quantificados pelo espectrofotômetro NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante. A concentração do DNA foi determinada no comprimento de onda de 260 nm por se tratar do pico de máxima absorção dos ácidos nucleicos. Enquanto isso, a pureza foi indicada pela relação de absorbância 260/280 nm, sendo que a absorbância obtida a 280 nm determina a concentração de proteínas que podem ser extraídas juntamente com o DNA. Amostras de DNA que apresentam relação 260/280 nm de 1,7 a 1,9 são consideradas puras.

5.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Primeiramente, as amostras foram submetidas à amplificação do gene da beta globina humana e, em seguida, a PCRs com diferentes *primers* para detecção do DNA do HPV. A figura 6 representa o fluxograma das análises realizadas.

Figura 6 - Fluxograma das PCR's realizadas.



As PCRs foram feitas em um termociclador Mastercycle Personal® (Eppendorf, Alemanha) com protocolos definidos com base na literatura e testes realizados previamente no LBMM/UFSC. A relação e a sequência dos *primers* usados estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 - Relação e sequências dos *primers* utilizados nas PCRs.

<i>Primers</i>	<i>Sequência (5' - 3')</i>
PCO3	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC
PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
GP5+	TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC TAC
GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CA TAT TC
MY09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC
MY11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG
PGMY11-A	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG
PGMY11-B	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG
PGMY11-C	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG
PGMY11-D	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG
PGMY11-E	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG
PGMY09-F	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-G	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-H	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC
PGMY09-Ia	G CCA AGG GGA AAC TGA TC
PGMY09-J	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC
PGMY09-K	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC
PGMY09-L	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC
PGMY09-M	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC
PGMY09-N	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC
PGMY09-Pa	G CCC AAC GGA AAC TGA TC
PGMY09-Q	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC
PGMY09-R	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC
HMB01b	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT

Conjunto de primers utilizados e suas sequências. PCO3/4, GP5+/6+ e MY09/11 consistem em um único *primer forward* e um *primer reverse*, enquanto PGMY09/11 compreende cinco *primers forward* (11-A a 11-E) e 13 *primers reverse* (09-F a HMB01). O código das bases degeneradas para os iniciadores MY09 e MY11 é: M = A ou C, W = A ou T, Y = C ou T e R = A ou G.

As reações para detecção do HPV foram conduzidas utilizando água ultrapura como controle negativo e uma amostra de tecido parafinado de colo do útero com resultado histopatológico de neoplasia intraepitelial cervical de baixo grau (NIC I) positivo para HPV,

submetida às mesmas técnicas de remoção da parafina e extração do DNA que as amostras, como controle positivo da reação.

5.5.1 PCR com os iniciadores PCO3/4 para controle de qualidade do DNA extraído

Para verificar a qualidade do DNA extraído das amostras e a presença de inibidores da PCR foi realizada a amplificação do gene da beta globina humana com os *primers* PCO3/4 (Saiki et al., 1988) que amplificam um segmento de 110 pb do gene da beta globina humana. A reação foi realizada em volume final de 20 µl contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de cada iniciador, 12 µg/mL de Soro Albumina Bovina (BSA - Invitrogen™ Life Technologies), tampão da Taq DNA polimerase 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1,5 U de Taq *Platinum* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Life Technologies), 4 µL do DNA molde e água ultrapura em quantidade suficiente para (q.s.p.) 20 µl. As condições da PCR foram: 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos em 40 ciclos e um ciclo final de 72°C por 7 minutos.

A PCR foi conduzida utilizando água ultrapura como controle negativo e uma amostra controle positivo para o gene da beta globina humana.

5.5.2 PCR com iniciadores GP5+/6+ para detecção do HPV

As amostras que amplificaram o gene da beta globina humana foram submetidas à PCR com os *primers* consenso GP5+/6+ (de RODA-HUSMAN et al., 1995) que amplificam um segmento de 150 pb da região L1 do HPV. A reação foi realizada em volume final de 20 µl contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µM de cada iniciador, tampão da Taq polimerase 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1 U de Taq *Platinum* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Life Technologies), 5 µl do DNA molde e água ultrapura q.s.p. 20 µl. As condições da PCR foram: 94°C por 1 minuto, 40°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto em 40 ciclos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

5.5.3 PCR com iniciadores MY09/11 e *nested* PCR MY/GP+ para detecção do HPV

As amostras que amplificaram o gene da beta globina humana foram submetidas à PCR com os *primers* MY09/11 (Manos et al., 1989) que amplificam um segmento de 450 pb da região L1 do HPV. A reação foi realizada em volume final de 20 µl contendo 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de cada iniciador; tampão da Taq polimerase 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 5 U de Taq *Platinum* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Life Technologies), 5 µL do DNA molde e água ultrapura q.s. p. 20 µl. As condições da PCR foram: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto em 40 ciclos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, as amostras negativas na PCR MY09/11 foram submetidas à PCR com os *primers* consenso GP5+/6+, utilizando-se como DNA molde 1 µl dos produtos não amplificados (*nested* PCR MY/GP+). A reação foi realizada conforme o item 5.5.2 desta seção.

5.5.4 PCR com iniciadores PGMY09/11 e *nested* PCR PGMY/GP+ para detecção do HPV

As amostras que amplificaram o gene da beta globina humana foram submetidas à PCR com os *primers* PGMY09/11 (GRAVITT et al., 2000) que amplificam um segmento de 450 pb da região L1 do HPV. A reação foi realizada em volume final de 20 µl contendo 3,0 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmoles de cada iniciador; tampão da Taq polimerase 1X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 2 U de Taq *Platinum* DNA polimerase recombinante (Invitrogen™ Life Technologies), 5 µl do DNA molde e água ultrapura q.s.p. 20 µl. As condições da PCR foram: 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto em 40 ciclos e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, as amostras negativas na PCR PGMY09/11 foram submetidas à PCR com os *primers* consenso GP5+/6+, utilizando-se como DNA molde 1 µl dos produtos não amplificados (*nested* PCR PGMY/GP+). A reação foi realizada conforme o item 5.5.2 desta seção.

5.5.5 Separação eletroforética

Os produtos amplificados na PCR do gene da beta globina humana foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio (1 µg/mL), em tampão TAE 1X (Tris acetato 40 mM/EDTA 1 mM), a 80 Volts (V) por 40 minutos. Para isto, acrescentou-se 1µL de *loading buffer* 6X (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cyanol e 10% 10X TAE) a 5µL do produto amplificado que foi aplicado no gel.

Da mesma forma, foi realizada a separação dos produtos amplificados nas reações para a detecção do DNA do HPV, porém neste caso foi utilizado gel de agarose 2% e a eletroforese foi conduzida a 100 V por 30 minutos.

Os fragmentos das amostras foram comparados com o produto amplificado a partir da amostra controle positivo e o tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação a um marcador de tamanho molecular de DNA (DNA ladder 100 pb, Invitrogen™ Life Technologies).

Os géis foram visualizados por iluminação ultravioleta de 320 nm (HOEFER-MacroBue UV-20) e fotografado através de um sistema de fotodocumentação de géis (DOC-PRINT® Biosystems).

5.6 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As informações clínicas dos pacientes como sexo, idade, localização anatômica das lesões e fatores de risco para o câncer de boca foram obtidos a partir das fichas de solicitação de biópsia arquivadas pelo LPB/UFSC.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar o nível de concordância entre as PCRs com diferentes *primers* para a detecção do DNA do HPV foi utilizado o teste *kappa*. A interpretação da concordância foi realizada conforme Altman (1991), descrita na tabela 4.

Tabela 4 - Interpretação da concordância do teste *kappa*.

Valor de <i>kappa</i>	Concordância
< 0,20	Fraca
0,21-0,40	Baixa
0,41-0,60	Moderada
0,61-0,80	Boa
0,80-1,00	Excelente

A associação entre a presença do HPV e os outros fatores de risco do CCEO foi analisada pelo teste qui-quadrado. As análises foram realizadas utilizando-se o software MedCalc (versão 14.8.1).

6 RESULTADOS

6.1 AMOSTRAS E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

No período de setembro de 2006 a dezembro de 2013 foram diagnosticados 79 novos casos de CCEO em pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia da UFSC. Destes, 13 casos foram excluídos por se tratarem de lesões localizadas nos lábios. Dos 66 casos restantes apenas 26 apresentaram quantidade de material suficiente para a realização da microtomia e foram coletados para o estudo.

6.2 QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO DNA EXTRAÍDO

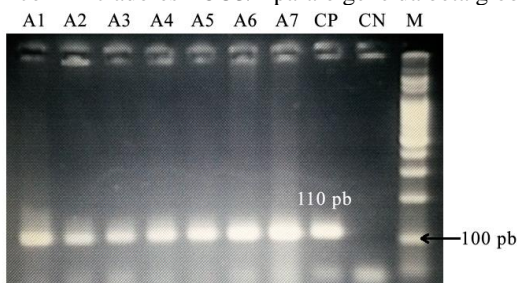
Os DNAs extraídos apresentaram concentrações variando de 8 a 1.320 ng/μl, com média de 225 ng/μl e foram diluídos com água ultrapura para aproximadamente 100 ng/μl para a realização das PCRs. A relação 260/280 nm variou de 1,5 a 1,9 com média de 1,7.

6.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

6.3.1 PCR com os iniciadores PCO3/4 para controle de qualidade do DNA extraído

Das 26 amostras submetidas à PCR com os *primers* PCO3/4 (Figura 7), 11,5% (3/26) não amplificaram o gene da beta globina humana e foram consideradas inviáveis para a pesquisa de HPV.

Figura 7 - PCR com iniciadores PCO3/4 para o gene da beta globina humana.

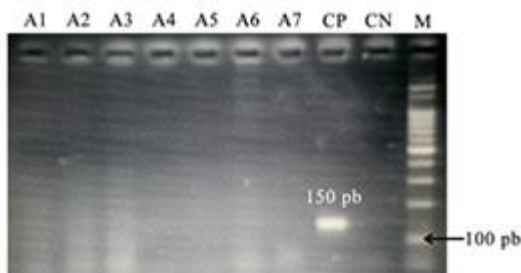


A1 a A7: amostras positivas para beta globina humana; CP: controle positivo da reação; CN: controle negativo da reação; M: marcador de tamanho molecular de 100 pb.

6.3.2 PCR com iniciadores GP5+/6+ para detecção do HPV

As 23 amostras positivas na amplificação do gene da beta globina humana foram submetidas à PCR com os *primers* GP5+/6+ (Figura 8) para a detecção do HPV. Nesta reação, nenhuma das amostras (0,0%) apresentou resultado positivo.

Figura 8 - PCR com iniciadores GP5+/6+ para o DNA do HPV.

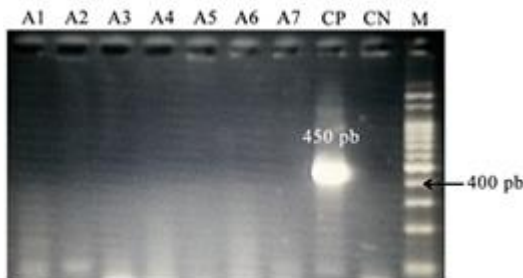


A1 a A6: amostras negativas para HPV; CP: controle positivo da reação; CN: controle negativo da reação; M: marcador de tamanho molecular de 100 pb.

6.3.3 PCR com iniciadores MY09/11 e *nested* PCR MY/GP+ para detecção do HPV

As 23 amostras positivas na amplificação do gene da beta globina humana foram submetidas à PCR com os *primers* MY09/11 (Figura 9) e à *nested* PCR MY/GP+ para a detecção do HPV. Nestas reações, nenhuma das amostras (0,0%) apresentou resultado positivo.

Figura 9 - PCR com iniciadores MY09/11 para o DNA do HPV.

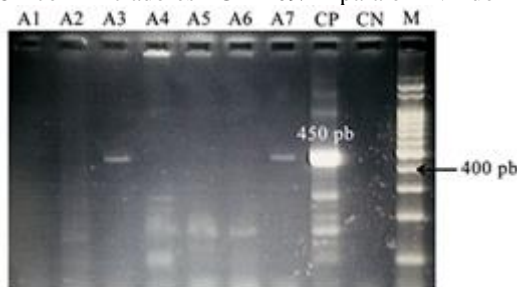


A1 a A6: amostras negativas para HPV; CP: controle positivo da reação; CN: controle negativo da reação; M: marcador de tamanho molecular de 100 pb.

6.3.4 PCR com iniciadores PGMY09/11 e *nested* PCR PGMY/GP+ para detecção do HPV

As 23 amostras positivas na amplificação do gene da beta globina humana foram submetidas à PCR com os *primers* PGMY09/11 (Figura 10) para a detecção do HPV. Nesta reação, três amostras (13,0%) apresentaram resultados positivos.

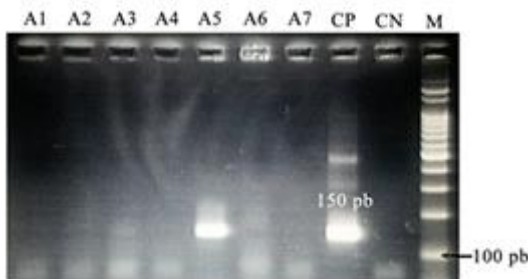
Figura 10 - PCR com iniciadores PGMY09/11 para o DNA do HPV.



A1, A2, A4, A5 e A6: amostras negativas para HPV; A3 e A7: amostras positivas para HPV; CP: controle positivo da reação; CN: controle negativo da reação; M: marcador de tamanho molecular de 100 pb.

As 20 amostras negativas na PCR com os *primers* PGMY09/11 foram submetidas à subsequente PCR com os *primers* GP5+/6+ (Figura 11) para a detecção do HPV. Nesta reação uma amostra apresentou resultado positivo, totalizando 17,4% (4/23) de positividade para o HPV pela *nested* PCR PGMY/GP+.

Figura 11 - *Nested* PCR com iniciadores PGMY/GP+ para o DNA do HPV.

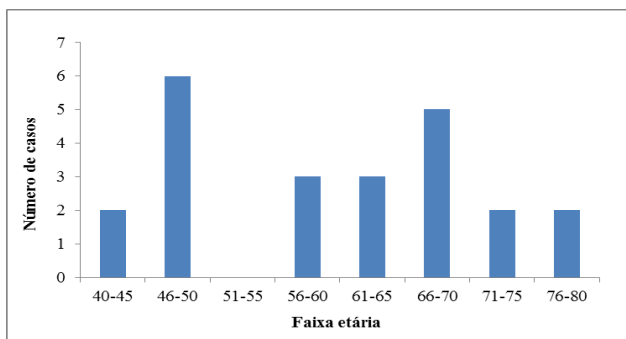


A1, A2, A3, A4, A6 e A7: amostras negativas para HPV; A5: amostra positiva para HPV; CP: controle positivo da reação; CN: controle negativo da reação; M: marcador de tamanho molecular de 100 pb.

6.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Das 23 amostras viáveis para pesquisa do HPV, 91,3% (21/23) eram de pacientes homens e 8,7% (2/23) de mulheres. A idade mediana foi de 61 anos, variando de 41 a 80 anos. A faixa de idade maior que 45 anos representou 91,3% (21/23) dos casos, enquanto a faixa igual ou menor que 45 anos representou 8,7% (2/23) dos casos. A distribuição do número de casos por faixa etária está demonstrada na figura 12.

Figura 12 - Distribuição do número de casos de CCEO por faixa etária.



A localização anatômica mais acometida foi o assoalho bucal representando 30,4% (7/23) dos casos, seguida pelo palato mole com 26,1% (6/23), sendo que em três destes casos também havia lesões no palato duro. As demais lesões ocorreram na língua (4/23), região retromolar (3/23) e mucosa jugal (3/23), somando juntas 43,5% (10/23) dos casos. Quanto aos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do CCEO, 60,9% (14/23) dos pacientes declararam ser tabagistas e 13,0% (3/23) ex tabagistas, enquanto 30,4% (7/23) declararam-se etilistas e 21,7% (5/23) ex etilistas. Todos os pacientes que relataram exposição ao álcool (etilistas e ex etilistas) também relataram exposição ao tabaco (tabagistas e ex tabagistas).

Em 26,1% (6/23) dos casos foram registrados outros fatores de risco, sendo que 17,4% (4/23) dos pacientes faziam uso de prótese, um paciente era desdentado total inferior sem uso de prótese e um paciente possuía histórico de câncer de pulmão, representando 4,3% cada.

6.5 ANÁLISE DA CONCORDÂNCIA ENTRE AS PCRs

A análise estatística indicou que não houve concordância entre os resultados das PCRs convencionais com uso dos *primers* GP5+/6+, MY09/11 e PGMY09/11 (Tabela 5), nem entre os resultados das *nested* PCRs com o uso dos *primers* MY/GP+ e PGMY/GP+ (Tabela 6) para a detecção do DNA do HPV (todos os valores de *kappa* iguais a 0,0).

Tabela 5 - Concordância dos resultados entre as PCRs com os *primers* GP5+/6+, MY09/11 e PGMY09/11.

	PGMY09/11 Positivos	PGMY09/11 Negativos	Total
GP5+/6+ Positivos	0 (0,0%)	0 (0,0%)	23
GP5+/6+ Negativos	3 (13,0%)	20 (87,0%)	(100%)
MY09/11 Positivos	0 (0,0%)	0 (0,0%)	23
MY09/11 Negativos	3 (13,0%)	20 (87,0%)	(100%)

Kappa = 0,0 (95% CI = 0,0)

Tabela 6 - Concordância dos resultados entre as *nested* PCRs com os *primers* MY/GP+ e PGMY/GP+.

	PGMY/GP+ Positivos	PGMY/GP+ Negativos	Total
MY/GP+ Positivos	0 (0,0%)	0 (0,0%)	23
MY/GP+ Negativos	4 (17,4%)	19 (82,6%)	(100%)

Kappa = 0,0 (95% CI = 0,0)

6.6 PREVALÊNCIA DO HPV E SUA ASSOCIAÇÃO COM OUTROS FATORES DE RISCO

A prevalência total do HPV nas 23 amostras analisadas foi de 17,4% (4/23). Destes, 50% (2/2) ocorreram em pacientes com idade igual ou menor que 45 anos e 75% (3/4) ocorreram em homens. Além disso, 75% (3/4) dos pacientes consumiam tabaco, sendo que 50% (2/4) faziam consumo de tabaco e álcool. Em 25% dos casos (1/4) não houve relato do consumo de nenhuma dessas substâncias. A análise estatística mostrou que não houve associação entre a infecção pelo HPV e os demais fatores de risco analisados (Tabela 7).

Tabela 7 - Associação entre a infecção pelo HPV e outros fatores de risco para o CCEO.

Variáveis		HPV positivo	HPV negativo	CC*
Idade	≤ 45 anos	2 (8,7%)	0 (0,0%)	0,425
	> 45 anos	2 (8,7%)	19 (82,6%)	
Sexo	Masculino	3 (13,0%)	18 (78,3%)	0,062
	Feminino	1 (4,3%)	1 (4,3%)	
Tabaco	Sim	3 (13,0%)	14 (60,9%)	0,118
	Não	1 (4,3%)	5 (21,7%)	
Álcool	Sim	2 (8,7%)	10 (43,5%)	0,094
	Não	2 (8,7%)	9 (39,1%)	
Outros fatores	Sim	0 (0,0%)	6 (26,1%)	0,141
	Não	4 (17,4%)	13 (56,5%)	

*Valores do coeficiente de contingência do teste qui-quadrado.

7 DISCUSSÃO

A carcinogênese do HPV nos CCECP é bem estabelecida (RAMPIAS et al., 2013; RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2012) e nos últimos anos tem sido observada uma proporção crescente de casos associados ao vírus (CHATURVEDI et al., 2011; NÄSMAN et al., 2009). A maioria destes casos é relacionada ao HPV 16, sendo estimado que este tipo viral esteja presente em mais de 90% dos CCECP HPV positivos (PANWAR et al., 2014).

Em níveis moleculares, os tumores HPV positivos diferenciam-se dos tumores HPV negativos, principalmente, pelos níveis aumentados da proteína supressora tumoral p16 e pela presença de um tipo selvagem da p53, responsável pelo controle do ciclo celular e apoptose (RAGIN, TAIOLI, 2007; PANWAR et al., 2014). Estas características têm levado os pesquisadores a sustentar o fato de que existem, ao menos, duas vias possíveis para a carcinogênese dos CCECP, uma conduzida pelos efeitos mutagênicos do tabaco e álcool e a outra conduzida pela transformação maligna mediada pelo HPV (PANWAR et al., 2014).

Além disso, os pacientes com CCECP HPV positivos apresentam perfis totalmente diferenciados dos pacientes com tumores HPV negativos. Em geral, tratam-se de indivíduos mais jovens, com pouca ou nenhuma exposição ao tabaco e álcool e com comportamento sexual considerado de risco, particularmente quanto ao número de parceiros e à prática de sexo oral (DESCHLER et al., 2014; D'SOUZA et al., 2014).

Devido ao caráter distintivo dos carcinomas da cabeça e pescoço associados ao HPV, a detecção do vírus como parte da rotina no diagnóstico dos CCECP tem sido amplamente discutida (WESTRA, 2014). Clínicos e pesquisadores reconhecem que o comportamento clínico e biológico favorável da positividade do HPV nos CCECP pode possibilitar a diminuição da intensidade da terapia neste grupo de pacientes, visando à redução da toxicidade relacionada ao tratamento e, consequentemente, à redução de morbidades e gastos em saúde pública (PANWAR et al., 2014).

Existem evidências de estudos retrospectivos de CCECP que indicam que os tumores HPV positivos respondem de forma diferente e melhor do que os tumores negativos para o HPV (ANG et al., 2010; DESCHLER et al., 2014; FAKHRY et al., 2008; GILLISON et al., 2008; HECK et al., 2010). Porém, ainda não existem resultados de estudos prospectivos que analisam especificamente os CCECP HPV positivos e o impacto na modificação da terapia. Por isso, até que estes

resultados sejam bem estabelecidos o manejo dos CCECP HPV positivos não deve ser diferenciado (PANWAR et al., 2014).

Atualmente, as recomendações para o manejo dos CCECP HPV positivos e HPV negativos são as mesmas (NCCN, 2013). Os protocolos baseiam-se no estadiamento e localização do tumor e a escolha do tratamento também depende de características do paciente, como idade, comorbidades, elegibilidade para cirurgia e as escolhas pessoais de cada indivíduo.

Recentemente, o *College of American Pathologists* publicou um protocolo recomendando a detecção do HPV por ISH ou a determinação do p16 por imunohistoquímica como parte padrão na avaliação dos casos de CCE da orofaringe (SEETHALA et al., 2013). Porém, tanto o protocolo padrão quanto o método mais adequado para a análise do HPV ainda não foram definidos, o que tem gerado resultados discrepantes na prevalência do vírus e dúvidas sobre quando e por que avaliar o *status* do HPV. Assim, o teste para HPV nunca é requisitado ou é requisitado indiscriminadamente, sem qualquer relação contextual com a localização anatômica, achados microscópicos, relevância clínica ou outros fatores que possam influenciar a importância da sua detecção (WESTRA, 2014). Com isso, verifica-se a necessidade de padronizar um método de detecção do HPV mais eficiente e que tenha melhor tempo, trabalho e custo benefício e que seja aplicável para as diversas amostras clínicas (WINDER et al., 2009).

Durante muitos anos o foco da pesquisa do HPV foram as amostras cervicais e PCRs utilizando *primers* consenso, como o conjunto de primers degenerados MY09/11 (MANOS et al., 1989) e a versão estendida GP5+/6+ dos iniciadores GP5/6 (de RODA HUSMAN et al., 1995). Estes iniciadores amplificam a região conservada L1 do genoma viral, permitindo a detecção de uma ampla gama de tipos de HPVs (RADY et al., 1995).

As similaridades evidentes entre os tumores cervicais e da cabeça e pescoço têm levado à utilização das mesmas ferramentas diagnósticas para o estudo epidemiológico e para a detecção precoce do HPV como meios preditivos para o desenvolvimento do câncer nestes dois casos. Por outro lado, existem evidências convincentes de que técnicas especialmente desenvolvidas para a detecção do HPV nos CCECP devem ser empregadas, uma vez que nestes tumores a associação com o vírus reflete no prognóstico dos pacientes, enquanto no colo do útero esta informação tem menor relevância clínica (VENUTI, PAOLINI, 2012).

Uma potencial limitação na sensibilidade das PCRs consenso é a possibilidade de que os *primers* que tem como alvo a região conservada L1 possa perder sequências do DNA do HPV que foram integradas ao genoma do hospedeiro e, assim, perderam as sequências codificadoras do capsídeo, não essenciais para a carcinogênese (HOWLEY, 1991). Entretanto, existem poucas evidências de que este fenômeno seja responsável por uma quantidade significativa de resultados falsos negativos (TATE et al., 1996).

Os resultados deste trabalho demonstram que na população atendida no Ambulatório de Estomatologia da UFSC no período de setembro de 2006 a dezembro de 2013 houve uma prevalência maior de CCEO em homens (91,3%) do que em mulheres (8,7%) e em pacientes com mais de 45 anos (91,3%) do que em pacientes com menos de 45 anos (8,7%). Estes resultados foram compatíveis com estudos anteriores que demonstram que o câncer de boca é mais prevalente em homens do que em mulheres e em indivíduos com mais de 45 anos (BRASIL, 2014; CANCELA et al., 2010; DESCHLER et al., 2014; WARNAKULASURIYA, 2009). A localização anatômica mais acometida foi o assoalho bucal (30,4%).

Quanto aos principais fatores de risco do CCEO, foi encontrada uma prevalência de 17,4% (4/23) de casos associados ao HPV. Além disso, 73,9% (17/23) dos casos foram associados à exposição ao tabaco e 52,2% (12/23) à exposição ao álcool e tabaco simultaneamente. Em 21,7% (5/23) dos casos, desconsiderando o sexo e a idade, não havia registro de nenhum fator de risco nas fichas clínicas dos pacientes. Entretanto, não é possível determinar se esses pacientes realmente não apresentavam fatores de risco, se omitiram essa informação ou se não foram questionados sobre isso no momento do atendimento. Destes 21,7%, um caso foi detectado positivo para o HPV, sendo associado exclusivamente à infecção pelo vírus.

Os dados obtidos sugerem, portanto, que na população estudada a maior parte dos casos de CCEO é relacionada ao consumo de tabaco e álcool. Foi observado, ainda, que não houve associação estatística entre a presença do HPV e o consumo dessas substâncias. Estes resultados são compatíveis com outros estudos que demonstram que estes fatores agem de forma independente entre si na carcinogênese oral (HASHIBE et al., 2009; SMITH et al., 2012).

Apesar de não ter sido encontrada associação estatisticamente significativa entre a infecção pelo HPV e a idade, observou-se que os dois casos de CCEO que ocorreram em pacientes mais jovens (com idade igual ou menor que 45 anos) foram detectados positivos para o

vírus. Estes resultados demonstram uma tendência de que os CCECP que ocorrem em pacientes com menos de 45 anos são, geralmente, associados ao HPV (DESCHLER et al., 2014).

A PCR com os *primers* PCO3/4 para a amplificação do gene da beta globina humana demonstrou que os protocolos de remoção da parafina e extração do DNA utilizados neste estudo para as amostras FFEP permitiram a obtenção de 88,5% (23/26) de amostras viáveis para a análise por PCR. Na rotina clínica isso significaria que 11,5% (3/26) dos pacientes não teriam a possibilidade da avaliação do *status* do HPV a partir destas amostras por PCR. Esta informação pode ser útil para estudos posteriores que tenham como objetivo à padronização do método ideal para a detecção do vírus.

Alguns estudos sugerem que amostras FFEP podem ser degradadas em fragmentos menores que 250 pb devido a reações cruzadas induzidas pela fixação em formalina e, por isso, apenas reações que geram produtos menores que 250 pb, como a PCR com os *primers* GP5+/6+ seriam aplicáveis com segurança (SNIJDERS et al., 2010). Mas, no presente estudo, estes *primers* não foram capazes amplificar o DNA do HPV em nenhuma das amostras pesquisadas. Em outro estudo realizado no Brasil, que incluiu 23 amostras FFEP e 17 amostras de tecidos frescos de CCEO, de pacientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiania, a prevalência do HPV pesquisada com os *primers* GP5+/6+ também foi igual a 0% (RIVERO, NUNES, 2006).

Os *primers* MY09/11 também não amplificaram o DNA do HPV em nenhuma das amostras, mesmo quando foi realizada a *nested* PCR. Estes resultados são discordantes de outros estudos feitos no Brasil. Miguel et al. (1998), por exemplo, analisaram 45 amostras congeladas de CCECP e encontraram 11% de positividade para o HPV pela técnica de PCR com estes mesmos *primers*. E ainda, no estudo de Miyahara et al. (2011) foi encontrada uma prevalência de 33,7% de casos associados ao vírus pela *nested* PCR MY/GP+ em 83 amostras FFEP de CCE da orofaringe e assoalho bucal. Ainda no Brasil, estudos realizados pela técnica de ISH por Soares et al. (2002) e Fregonsesi et al. (2003) detectaram 0% e 39% de HPV em amostras de CCEO, respectivamente.

No presente trabalho a PCR com os *primers* PGMY09/11 foi a única técnica capaz de detectar o DNA do HPV nas amostras pesquisadas, mostrando melhor desempenho quando seguida pela *nested* PCR PGMY/GP+. Portanto, a *nested* PCR com os *primers* PGMY/GP+ foi considerada a técnica mais adequada para a detecção do DNA do HPV em amostras FFEP de CCEO. Este resultado é compatível com estudos anteriores que demonstram que a *nested* PCR pode ser

necessária para confirmar a negatividade ou para detectar cargas virais baixas, indetectáveis pela PCR convencional (WINDER et al., 2009).

Devido ao resultado único de negatividade para o DNA do HPV nas PCRs com os *primers* GP5+/6+ e MY09/11, a análise estatística mostrou que não houve concordância ($kappa = 0,0$) na comparação entre as PCRs convencionais conduzidas com os *primers* GP5+/6+, MY09/11 e PGMY09/11. Entretanto, no estudo conduzido por Winder et al. (2009) que utilizou amostras de verrugas genitais, raspados cervicais, biópsias vulvares e câncer de orofaringe, foi observada uma concordância moderada entre estes três conjuntos de *primers*. Além disso, no estudo de Fuessel Haws et al. (2004) com amostras de raspados cervicais, a concordância entre os *primers* MY09/11 e PGMY09/11, tanto na PCR convencional como na *nested* PCR (MY/GP+ e PGMY/GP+), foi excelente, ainda que os *primers* PGMY09/11 tenham sido estatisticamente capazes de detectar mais tipos de HPV do que os *primers* MY09/11.

O conjunto de *primers* PGMY09/11 consiste em um *pool* de oligonucleotídeos iniciadores que se ligam na mesma região que os *primers* MY09/11, porém o fato de serem iniciadores não degenerados fornece uma medida de garantia de qualidade no desenho dos iniciadores. Além disso, desde o desenvolvimento dos *primers* MY09/11, muitos outros tipos de HPV que atingem as mucosas e genitais foram descobertos (FUESSEL-HAWS et al., 2004). No estudo conduzido por Gravitt et al. (2000) os *primers* PGMY09/11 demonstraram maior sensibilidade e capacidade de detectar uma maior variedade de tipos de HPV, especialmente em casos de infecções múltiplas. E ainda, detectaram os HPVs 26, 35, 42, 45, 52, 54, 55, 59, 66, 73 com pelo menos 25% mais frequência que os iniciadores MY09/11.

Vários métodos disponíveis atualmente são capazes de fornecer informações sobre a presença do HPV em amostras biológicas. Cada método possui vantagens e desvantagens próprias e, cada vez mais informações sobre as suas características técnicas, analíticas e clínicas específicas estão ou estarão disponíveis. Para a maioria dos laboratórios clínicos, a combinação de um teste sensível, como a PCR ou a imunohistoquímica para o p16, e um teste específico, como a ISH, permite obter o melhor potencial para determinar o *status* do HPV em uma determinada amostra. Contudo, a escolha do método mais adequado deve ser feita a partir de considerações práticas, bem como pela intenção do seu uso (VENUTI, PAOLINI, 2012).

Sendo assim, mais estudos tornam-se necessários para definir o método ideal de detecção do HPV e identificação das infecções clinicamente relevantes nos casos de CCECP, bem como estudos posteriores de base populacional que determinem a real prevalência do HPV nos casos de CCECP e CCEO no Brasil.

8 CONCLUSÃO

Na população estudada, a maioria dos casos de CCEO foi associada ao consumo de tabaco e/ou álcool e apenas 17,4% do total de casos foram associados à infecção pelo HPV. Não houve associação estatisticamente comprovada entre a presença do vírus e o consumo de tabaco e álcool, confirmando que estes fatores agem de forma independente na carcinogênese oral. Os resultados deste estudo sugerem que a *nested* PCR PGMY/GP+ é a técnica mais adequada para a detecção do DNA do HPV em amostras FFEP de tecido oral. Ainda assim, mais estudos são necessários para a definição do método ideal de detecção do HPV e para a determinação da real prevalência do HPV nos casos de CCECP e CCEO no Brasil.

9 PERSPECTIVAS

- Verificar quais são os tipos mais frequentes de HPV em casos de CCEO dos pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia da UFSC;
- Avaliar a utilização da técnica de ISH para a detecção do DNA do HPV em amostras FFEP em casos de CCEO;
- Comparar a aplicação das técnicas de ISH e PCR para a detecção do DNA do HPV em amostras FFEP em casos de CCEO.

REFERÊNCIAS

ALBA, A.; CARARACH, M.; RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. The Human Papillomavirus (HPV) in Human Pathology: Description, Pathogenesis, Oncogenic Role, Epidemiology and Detection Techniques. **The Open Dermatology Journal**, v. 3, p. 90-102, 2009.

ALTMAN, D. G. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall, 1991.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Oral cavity and oropharyngeal cancer detailed guide. 2013. 68p.

ANANTHARAMAN, D.; CHABRIER, A.; GABORIEAU, V.; FRANCESCHI, S.; HERRERO, R.; RAJKUMAR, T.; SAMANT, T.; MAHIMKAR, M. B.; BRENNAN, P.; MCKAY, J. D. Genetic variants in nicotine addiction and alcohol metabolism genes, oral cancer risk and the propensity to smoke and drink alcohol: a replication study in India. **Plos One**, v. 9, n. 2, 2014

ANG, K. K.; HARRIS, J.; WHEELER, R.; WEBER, R.; ROSENTHAL, D. I.; NGUYEN-TÂN, P. F.; WESTRA, W. H.; CHUNG, C. H.; JORDAN, R. C.; LU, C.; KIM, H.; AXELROD, R.; SILVERMAN, C. C.; REDMOND, K. P.; GILLISON, M. L. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 1, p. 24-35, 2010.

BAKER, T. S.; NEWCOMB, W. W.; OLSON, N. H.; OLSON, O.; BROWN, J. C. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three dimensional image reconstruction. **Biophysical Journal**, v. 60, n. 6, p. 1445-1456, 1991.

BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D., editors. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon, France: World Health Organization/IARC Press; 2005.435P.

BEST, S. R.; NIPARKO, K. J.; PAI, S. I. Biology of HPV infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 807-822, 2012.

BHATLA, N.; SINGLA, S.; AWASTHI, D. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in developed countries. **Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 26, n. 2, p. 209–220, 2012.

BOSHART, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; KLEINHEINZ, A.; SCHEURLLEN, W.; zur HAUSEN, H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 3, p. 1151–1157, 1984.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Falando sobre câncer de boca. Rio de Janeiro: INCA, 2002. 52p.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). TNM: classificação de tumores malignos. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p

BRASIL. Ministério da saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Câncer de Boca. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324. Acesso em maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde Bucal. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRENER, S.; JEUNON, F. A.; BARBOSA, A. A.; GRANDINETTI, H. A. M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63-69, 2007.

BRINK, A. A.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. HPV detection methods. **Disease Markers**, v. 23, n. 4, p. 273-281, 2007.

BÖCKING, A.; SPROLL, C.; STÖCKLEIN, N.; NAUJOKS, C.; DEPPRICH, R.; KÜBLER, N. R.; HANDSCHEL, J. Role of brush biopsy and DNA cytometry for prevention, diagnosis, therapy, and followup care of oral cancer. **Journal of Oncology**, v. 2011, 2011.

BUCK, C. R.; THOMPSON, C. D.; PANG, Y. Y. S.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. Maturation of Papillomavirus capsids. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 2839-2846, 2005.

CANCELA, M. C.; VOTI, L.; GUERRA-YI.; CHAPUIS, F.; MAZUIR, M.; CURADO, M. P. Oral cavity cancer in developed and in developing contries: population based incidence. **Head & Neck**, v. 32, n. 3, p. 357-367, 2010.

CASTELLSAGUÉ, X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. **Gynecology Oncology**, v. 3, n. 2, p. 4-7, 2008.

CASTRO, T. P. P. G.; BUSSOLOTI FILHO, I. Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 2, p. 272-282, 2006.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; ANDERSON, W. F.; GILLISON, M. L. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 4, p. 612-619, 2008.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; PFEIFFER, R. M.; HERNANDEZ, B. Y.; XIAO, W.; KIM, E.; JIANG, B.; GOODMAN, M. T.; SIBUG-SABER, M.; COZEN, W.; LIU, L.; LYNCH, C. F.; WENTZENSEN, N.; JORDAN, R. C.; ALTEKRUSE, S.; ANDERSON, W. F.; ROSENBERG, P. S.; GILLISON, M. L. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 32, p. 4294-4301, 2011.

CHAUDHARY, A. K.; PANDYA, S.; MEHROTRA, R.; BHARTI, A.; SINGH, M.; SINGH, M. Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. **Virology Journal**, v. 7, p. 253 – 262, 2010.

CLAVEL, C.; MASURE, M.; PUTAUD, I.; THOMAS, K.; BORY, J. P.; GABRIEL, R.; QUEREUX, C.; BIREMBAUT, P. Hybrid capture II, a new sensitive test for human papillomavirus detection. Comparison with hybrid capture I and PCR results in cervical lesions. **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, n. 10, p. 737-740, 1998.

CLIFFORD, G. M.; SMITH, J. S.; PLUMMER, M.; MUÑOZ, N.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta analysis. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 1, p. 63-73, 2003.

COOPER, J. S.; PORTER, K.; MALLIN, K.; HOFFMAN, H. T.; WEBER, R. S.; ANG, K. K.; GAY, E. G.; LANGER, C. J. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. **Head & Neck**, v. 31, n. 6, p. 748-758, 2009.

CURADO, M. P.; EDWARDS, B.; SHIN, H. R.; STORM, H.; FERLAY, J. HEANUE, M.; BOYLE, P. Cancer incidence in five continents, v. IX. Lyon: IARC, 2007, 961p.

DAHLSTRAND, H. M.; LINDQUIST, D.; BJÖRNESTÅL, L.; OHLSSON, A.; DALIANIS, T.; MUNCK-WIKLAND, E.; ELMBERGER, G. p16INK4a correlates to human papillomavirus presence, response to radiotherapy and clinical outcome in tonsillar carcinoma. **Anticancer Research**, v. 25, n. 6C, p. 4375-4383, 2005.

DAYYANI, F.; ETZEL, C. J.; LIU, M.; HO, C. H.; LIPPMAN, S. M.; TSAO, A. S. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head and Neck Oncology**, 2010.

de RODA HUSMAN, A. M.; WALBOOMERS, J. M. M.; VAN DEN BRULE, A. J. C.; MEIJER, C. J. L. M.; SNIJDERS, P. J. F. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1057 – 1062, 1995.

de VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; zur HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17-27, 2004.

DESCHLER, D. G.; RICHMON, J. D.; KHARIWALA, S. S.; FERRIS, R. L.; WANG, M. B. The "New" Head and Neck Cancer Patient-Young, Nonsmoker, Nondrinker, and HPV Positive: Evaluation. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 2104.

DIAZ, E. M., et al. Head and Neck. In: KUFER, D. W.; BAST, R. C.; HAIT, W. N.; et al, editors. *Cancer medicine*, 7th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker; 2006. p. 1131–1178.

DOORBAR, J. Papillomavirus life cycle organization and biomarker selection. **Disease Markers**, v. 23, n. 4, p. 297-313, 2007.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 1, p. 7-15, 2005.

DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R.; STANLEY, M. A. The biology and life cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, n. 5, p. 55-70, 2012.

DRIEMEL, O.; KUNKEL, M.; HULLMANN, M.; EGDELING, F. V.; RICHTER, U. M.; KOSMEHL, H.; REICHERT, T. E. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 5, n. 12, p. 1095 – 1100, 2007 (A).

DRIEMEL, O.; DAHSE, R.; BERNDT, A.; PISTNER, H.; HAKIM, S. G.; ZARDI, L.; REICHERT, T. E.; KOSMEHL, H. High-molecular Tenascin-C as an indicator of atypical cells in oral brush biopsies. **Clinical Oral Investigation**, v. 11, n. 1, p. 93-99, 2007 (B).

D'SOUZA, G.; KREIMER, A. R.; VISCIDI, R.; PAWLITA, M.; FAKHRY, C.; KOCH, W. M.; WESTRA, W. H.; GILLISON, M. L. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 19, p. 1944-1956, 2007.

D'SOUZA, G.; CULLEN, K.; BOWIE, J.; THORPE, R.; FAKHRY, C. Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection. **Plos One**, v. 9, n. 1, 2014.

DÜRST, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; zur HAUSEN, H.; A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in câncer biopsy samples from different geographic regions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 3812–3815, 1983.

EMMADI, R.; BOONYARATANAKORNKIT, J. B.; SELVARANGAN, R.; SHYAMALA, V.; ZIMMER, B. L.; WILLIAMS, L.; BRYANT, B.; SCHUTZBANK, T.; SCHOONMAKER, M. M.; AMOS WILSON, J. A.; HALL, L.; PANCHOLI, P.; BERNARD, K. Molecular methods and platforms for infectious diseases testing a review of FDA-approved and cleared assays. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 6, p. 583-604, 2011.

EPSTEIN, J. B.; SCULLY, C.; SPINELLI, J. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 21, n. 4, p. 160–163, 1992.

FAKHRY, C.; WESTRA, W. H.; LI, S.; CMELAK, A.; RIDGE, J. A.; PINTO, H.; FORASTIERE, A.; GILLISON, M. L. Improved survival of patients with human papillomavirus positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 4, p. 261-269, 2008.

FAVRE, M.; ORTH, G.; CROISSANT, O.; YANIV, M. Human papillomavirus DNA: physical map. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 12, p. 4810-4814, 1975.

FAVRE, M.; RAMOZ, N.; ORTH, G. Human Papillomaviruses: general features. **Clinics in Dermatology**, v. 15, n. 2, p. 181-198, 1997.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, v. 1.0, n. 11, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC [Internet].

FERNANDES, J. V.; MEISSNER, R. V.; CARVALHO, M. G. F.; FERNANDES, T. A. A. M.; AZEVEDO, P. R. M.; VILLA, L. L. Prevalence of HPV infection by cervical cytologic status in Brazil.

International **Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 105, p. 21–24, 2009.

FERTEY, J.; HURST, J.; STRAUB, E.; SCHENKER, A.; IFTNER, T.; STUBENRAUCH, F. Growth inhibition of HeLa cells is a conserved feature of high-risk human papillomavirus E8^{E2C} proteins and can also be achieved by an artificial repressor protein. **Journal of Virology**, v. 85, n. 6, p. 2918-2926, 2011.

FRANCESCHI, S.; FAVERO, A.; CONTI, E.; TALAMINI, R.; VOLPE, R.; NEGRI, E.; BARZAN, L.; LA VECCHIA, C. Food groups, oils and butter, and cancer of the oral cavity and pharynx. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 3-4, p. 614-620, 1999.

FRATTINI, M. G.; LAIMINS, L. A. The role of the E1 and E2 proteins in the replication of human papillomavirus type 31b. **Virology**, v. 204, n. 2, p. 799-804, 1994.

FREGONESI, P. A.; TERESA, D. B.; DUARTE, R. A.; NETO, C. B.; de OLIVEIRA, M. R.; SOARES, C. P. p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1291-1297, 2003.

FUESSEL HAWS, A. L.; HE, Q.; RADY, P. L.; ZHANG, L.; GRADY, J.; HUGHES, T. K.; STISSER, K.; KONIG, R.; TYRING, S. K. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. **Journal of Virological Methods**, v. 122, n. 1, p. 87-93, 2004.

GALLAGHER, R. P.; LEE, T. K.; BAJDIK, C. D.; BORUGIAN, M. Ultraviolet radiation. **Chronic Disease Cancer**, v. 29, n. 1, p. 51-68, 2010.

GENDEN, E. M.; FERLITO, A.; SILVER, C. E.; TAKES, R. P.; SUÁREZ, C.; OWEN, R. P.; HAIGENTZ, M. JR.; STOECKLI, S. J.; SHAHA, A. R.; RAPIDIS, A. D.; RODRIGO, J. P.; RINALDO, A. Contemporary management of cancer of the oral cavity. **European Archives of Otorhinolaryngology**, v. 267, n. 7, p. 1001-1007, 2010.

GILLISON, M. L.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W.; SUGAR, E.; XIAO, W.; BEGUM, S.; VISCIDI, R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16 positive and human papillomavirus type 16 negative head and neck cancers. **Journal of National Cancer Institute**, v. 100, n. 6, p. 407-420, 2008.

GILLISON, M. L.; BROUTIAN, T.; PICKARD, R. K.; TONG, Z. Y.; XIAO, W.; KAHLE, L.; GRAUBARD, B. I.; CHATURVEDI, A. K. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. **Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 7, p. 693-703, 2012.

GIROGLOU, T.; FLORIN, L.; SCHÄFER, F.; STREECK, R. E.; SAPP, M. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. **Journal of virology**, v. 75, n. 3, p. 1565-1570, 2001.

GIULIANO, A. R.; NYITRAY, A. G.; KREIMER, A. R.; PIERCE CAMPBELL, C. M.; GOODMAN, M. T.; SUDENGA, S. L.; MONSONEGO, J.; FRANCESCHI, S. EUROGIN 2014 roadmap: Differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. **International Journal of Cancer**, 2014.

GUHA, N.; BOFFETTA, P.; WÜNSCH FILHO, V.; ELUF NETO, J.; SHANGINA, O.; ZARIDZE, D.; CURADO, M. P.; KOIFMAN, S.; MATOS, E.; MENEZES, A.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; FERNANDEZ, L.; MATES, D.; DAUDT, A. W.; LISSOWSKA, J.; DIKSHIT, R.; BRENNAN, P. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. **American Journal of Epidemiology**, v. 166, n. 10, p. 1159-1173, 2007.

GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q.; WHEELER, C. M.; COUtlÉE, F.; HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M. H.; SCOTT, D. R.; APPLE, R. J. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.

HANEMANN, J. A. C.; MIYAZAWA, M.; SOUZA, M. S. G. S. Histologic grading and nucleolar organizer regions in oral squamous cell

carcinomas. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 3, p. 280-285, 2011.

HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; CHUANG, S. C.; BOCCIA, S.; CASTELLSAGUE, X.; CHEN, C.; CURADO, M. P.; DAL MASO, L.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WÜNSCH-FILHO, V.; FRANCESCHI, S.; HAYES, R. B.; HERRERO, R.; KELSEY, K.; KOIFMAN S, L. A.; VECCHIA, C.; LAZARUS, P.; LEVI, F.; LENCE, J. J.; MATES, D.; MATOS, E.; MENEZES, A.; MCCLEAN, M. D.; MUSCAT, J.; ELUF-NETO, J.; OLSHAN, A. F.; PURDUE, M.; RUDNAI, P.; SCHWARTZ, S. M.; SMITH, E.; STURGIS, E. M.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; TALAMINI, R.; WEI, Q.; WINN, D. M.; SHANGINA, O.; PILARSKA, A.; ZHANG, Z. F.; FERRO, G.; BERTHILLER, J.; BOFFETTA, P. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 2, p. 541-550, 2009.

HECK, J. E.; BERTHILLER, J.; VACCARELLA, S.; WINN, D. M.; SMITH, E. M.; SHAN'GINA, O.; SCHWARTZ, S. M.; PURDUE, M. P.; PILARSKA, A.; ELUF-NETO, J.; MENEZES, A.; MCCLEAN, M. D.; MATOS, E.; KOIFMAN, S.; KELSEY, K. T.; HERRERO, R.; HAYES, R. B.; FRANCESCHI, S.; WÜNSCH-FILHO, V.; FERNÁNDEZ, L.; DAUDT, A. W.; CURADO, M. P.; CHEN, C.; CASTELLSAGUÉ, X.; FERRO, G.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. **International Journal of Epidemiology**, v. 39, n. 1, p. 166-181, 2010.

HO, T.; WEI, Q.; STURGIS, E. M. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head & Neck**, v. 29, n. 7, p. 682-699, 2007.

HONG, S.; LAIMINS, L. A. Regulation of the life cycle of HPVs by differentiation and the DNA damage response. **Future Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1547-1557, 2013.

HOWLEY, P. M. Role of the human papillomaviruses in human cancer. **Cancer Research**, v. 51, n. 18, p. 5019-5022, 1991.

HUH, K.; ZHOU X.; HAYAKAWA, H.; CHO, J. Y.; LIBERMANN, T. A.; JIN, J.; HARPER, J. W.; MUNGER, K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. **Journal of Virology**, v. 81, n. 18, p. 9737-9747, 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: A Review of Human Carcinogens: Personal Habits and Indoor Combustions. Lyon: IARC Press, 2012, 579 p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. Human Papillomaviruses. Lyon: IARC Press, 2007.

JOYCE, J. G.; TUNG, J. S.; PRZYSIECKI, C. T.; COOK, J. C.; LEHMAN, E. D.; SANDS, J. A.; JANSEN, K. U.; KELLER, P. M. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus like particles interacts with heparina and cell surfasse glycosaminoglycans on human keratinocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 9, p. 5810-5820, 1999.

KÄMMERER, P. W.; KOCH, F. P.; SANTORO, M.; BABARYKA, G.; BIESTERFELD, S.; BRIEGER, J.; KUNKEL, M. Prospective, blinded comparison of cytology and DNA-image cytometry of brush biopsies for early detection of oral malignancy. **Oral Oncology**, v. 49, n. 5, p. 420-426, 2013.

KIVI, N.; GRECO, D.; AUVINEN, P.; AUVINEN, E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. **Oncogene**, v. 27, n. 18, p. 2532-2541, 2008.

KOUVOUSI, M.; XESFYNGI, D.; TSIMPLAKI, E.; ARGYRI, E.; IOANNIDOU, G.; PLOXOROU, M.; LAZARIS, A. C.; PATSOURIS, E.; PANOTOPOULOU, E. Prevalence of human papillomavirus in 45 greek patients with oral cancer. **Journal of Oncology**, 2013.

KOYAMA, K.; UOBE, K.; TANAKA, A. Highly sensitive detection of HPV-DNA in paraffin sections of human oral carcinomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 36, n. 1, p. 18-24, 2007.

LAJER, C. B.; von BUCHWALD, C. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 6-7, p. 510-519, 2010.

LAZARCZYK, M.; CASSONNET, P.; PONS, C.; JACOB, Y.; FAVRE, M. The EVER proteins as a natural barrier against Papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, n. 2, p. 348-370, 2009.

LEE, Y. C.; ZUGNA, D.; RICHIARDI, L.; MERLETTI, F.; MARRON, M.; AHRENS, W.; POHLABELN, H.; LAGIOU, P.; TRICHOPOULOS, D.; AGUDO, A.; CASTELLSAGUE, X.; BETKA, J.; HOLCATOVA, I.; KJAERHEIM, K.; MACFARLANE, G. J.; MACFARLANE, T. V.; TALAMINI, R.; BARZAN, L.; CANOVA, C.; SIMONATO, L.; CONWAY, D. I.; MCKINNEY, P. A.; THOMSON, P.; ZNAOR, A.; HEALY, C. M.; MCCARTAN, B. E.; BOFFETTA, P.; BRENNAN, P.; HASHIBE, M. Smoking addiction and the risk of upper-aerodigestive-tract cancer in a multicenter case-control study. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 11, p. 2688-2695, 2013.

LIANG, X. H.; LEWIS, J.; FOOTE, R.; SMITH, D.; KADEMANI, D. Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: the Mayo Clinic experience. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, n. 9, p. 1875-1880, 2008.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people - a comprehensive literature review. **Oral Oncology**, v.37, n. 5, p. 401-418, 2001.

LU, B.; VISCIDI, R. P.; WU, Y.; LEE, J. H.; NYITRAY, A. G.; VILLA, L. L.; LAZCANO-PONCE, E.; DA SILVA, R. J.; BAGGIO, M. L.; QUITERIO, M.; SALMERON, J.; SMITH, D. C.; ABRAHAMSEN, M. E.; PAPENFUSS, M. R.; STOCKWELL, H. G.; GIULIANO, AR. Prevalent serum antibody is not a marker of immune

protection against acquisition of oncogenic HPV16 in men. **Cancer Research**, v. 72, n. 3, p. 676-685, 2012.

MANOS, M. M.; TING, Y.; WRIGHT, D. K.; LEWIS, A. J.; BROKER, T. R.; WOLINSKY, S. M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p. 209-214, 1989.

MARAKI, D.; BECKER, J.; BÖCKING, A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral câncer. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 33, n. 7, p. 398-404, 2004.

MARTÍNEZ, G. G.; TROCONIS, J. N. Natural history of the infection for human papillomavirus: an actualization. **Revista de Investigación Clínica**, v. 55, n. 1, p. 82-91, 2014.

MATHEW, B.; SANKARANARAYANAN, R.; WESLEY, R.; KRISHNAN NAIR, M. Evaluation of mouth self examination in the controlo f oral câncer. **British Journal of Cancer**, v. 71, p. 397-399, 1995.

MAZON, R. C.; ROVIGATTI GERBELLI, T.; BENATTI NETO, C.; DE OLIVEIRA, M. R.; DONADI, A. E.; GONÇALVES M. A. G.; SOARES, E. G.; KLAY, C. P.; TERSARIOL, I.; PINHAL, M. A.; RESENDE, L.; SOARES, C. P. Abnormal cell-cycle expression of the proteins p27, mdm2 and cathepsin B in oral squamous-cell carcinoma infected with human papillomavirus. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 2, p. 109-1126, 2011.

McINTOSH, P. B.; MARTIN, S. R.; JACKSON, D. J.; KHAN, J.; ISAACSON, E. R.; CALDER, L.; RAJ, K.; GRIFFIN, H. M.; WANG, Q.; LASKEY, P.; ECCLESTON, J. F.; DOORBAR, J. Structural analysis reveals na amyloid form of the human papillomavirus type 16 E1^E4 protein and provides a molecular basis for its accumulation. **Journal of Virology**, v. 82, n. 16, p. 8196-8203, 2008.

MENDES, S. F.; RAMOS, G. O.; RIVERO, E. R.; MODOLO, F.; GRANDO, L. J.; MEURER, M. I. Techniques for precancerous lesion diagnosis. **Journal of Oncology**, 2011.

MEHROTRA, R.; GUPTA, A.; SINGH, M.; IBRAHIM, R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. **Molecular Cancer**, v. 5, n. 11, 2006.

MEHROTRA, R. The role of cytology in oral lesions: a review of recent improvements. **Diagnostic Cytopathology**, v. 40, n. 1, p. 73 – 83, 2011.

MEHROTRA, R.; MISHRA, S.; SINGH, M.; SINGH, M. The efficacy of oral brush biopsy with computer assisted analysis in identifying precancerous and cancerous lesions. **Head and Neck Oncology**, v. 3, n. 39, 2011.

MIGALDI M1, PECORARI M, FORBICINI G, NANNI N, GROTTOLA A, GRANDI T, DELLE DONNE G, LEOCATA P, TROVATO D, SGAMBATO A. Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 1, p. 16-20, 2012.

MIGUEL, R. E.; VILLA, L. L.; CORDEIRO, A. C.; PRADO, J. C.; SOBRINHO, J. S.; KOWALSKI, L. P. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. **The American Journal of Surgery**, v. 176, n. 5, p. 428-429, 1998.

MIYAHARA, G. I.; SIMONATO, L. E.; MATTAR, N. J.; CAMILO JR, D. J.; BIASOLI, E. R. Correlation between koilocytes and human papillomavirus detection by PCR in oral and oropharynx squamous cell carcinoma biopsies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 166-169, 2011.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 550-560, 2010.

MOORE, P. S.; CHANG, Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 12, p. 878-889, 2010.

MORK, J.; LIE, A. K.; GLATTRE, E.; HALLMANS, G.; JELLUM, E.; KOSKELA, P.; MØLLER, B.; PUKKALA, E.; SCHILLER, J. T.;

YOUNGMAN, L.; LEHTINEN, M.; DILLNER, J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 15, p. 1125-1131, 2001.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; de HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; de GONZÁLEZ, A. B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, n. 24, v. 3, p. 1-10, 2006.

MÜNGER, K.; BALDWIN, A.; EDWARDS, K. M.; HAYAKAWA, H.; NGUYEN, C. L.; OWENS, M.; GRACE, M.; HUH, K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. **Journal of Virology**, v. 78, n. 21, p. 11451-11460, 2004.

NÄSMAN, A.; ATTNER, P.; HAMMARSTEDT, L.; DU, J.; ERIKSSON, M.; GIRAUD, G.; AHRLUND-RICHTER, S.; MARKLUND, L.; ROMANITAN, M.; LINDQUIST, D.; RAMQVIST, T.; LINDHOLM, J.; SPARÉN, P.; YE, W.; DAHLSTRAND, H.; MUNCK-WIKLAND, E.; DALIANIS, T. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? **International Journal of Cancer**, v. 125, n. 2, p. 362-366, 2009.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology. Head and Neck Cancers. Version 2.2013, 2013.

NEVES, A. C.; RIVERO, E. R. C.; SILVA VALENZUELA, M. G.; SOUSA, S. C. O. M.; NUNES, F. D. Método de extração de DNA de material de arquivo pelo acetato de amônio e pelo isopropanol. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, 2002.

NIEBEL, H. H.; CHOMET, B. In vivo staining test for delineation of oral epithelial neoplastic change: Preliminary report. **Journal of American Dental Association**, v. 68, p. 801-806, 1964.

OBERMANN, E. C.; SAVIC PRINCE, S.; BARASCUD, A.; GRILLI, B.; HERZOG, M.; KAUP, D.; CATHOMAS, G.; FREY TIRRI, B.; ZLOBEC, I.; WIGHT, E.; BUBENDORF, L. Prediction of outcome in patients with low-grade squamous intraepithelial lesions by fluorescence in situ hybridization analysis of human papillomavirus, TERC, and MYC. **Cancer Cytopathology**, v. 121, n. 8, p. 423-431, 2013.

ONOFRE, F. B.; ONOFRE, A. S.; POMJANSKI, N.; BUCKSTEGGE, B.; GROTE, H. J.; BÖCKING, A. 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. **Cancer**, v. 114, n. 3, p. 204-215, 2008.

ORTH, G.; FAVRE, M.; CROISSANT, O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. **Journal of virology**, p. 108-120, 1977.

PANWAR, A.; BATRA, R.; LYDIATT, W. M.; GANTI, A. K. Human papillomavirus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: a growing epidemic. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 2, p. 215-219, 2014.

PEIXOTO, A. P.; CAMPOS, G. S.; QUEIROZ, L. B.; SARDI, S. I. Asymptomatic oral human papillomavirus (HPV) infection in women with a histopathologic diagnosis of genital HPV. **Journal of Oral Science**, v. 53, n. 4, p. 451-459, 2011.

PELTENBURG LT. Radiosensitivity of tumor cells. Oncogenes and apoptosis. Quarterly **Journal of Nuclear Medicine**, V. 44, N. 4, P. 355-364, 2000.

PIM, D.; BANKS, L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs low-risk human papillomaviruses. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 6-7, p. 471-493, 2010.

PÖSCHL, G.; SEITZ, H. K. Alcohol and cancer. **Alcohol Alcohol**, v. 39, n. 3, p. 155-165, 2004.

RADY, P. L.; ARANY, I.; HUGHES, T. K.; TYRING, S. K. Type-specific primer-mediated direct sequencing of consensus primer-generated PCR amplicons of human papilloma viruses: a new approach for the simultaneous detection of multiple viral type infections. **Journal of Virological Methods**, v.53, n. 2-3, p. 245-254, 1995.

RAGIN, C. C. R.; TAIOLI, E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1813-1820, 2007.

RAM, S.; SIAR, C. H. Chemiluminescence as a diagnostic aid in the detection of oral cancer and potentially malignant epithelial lesions. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 5, p. 521-527, 2005.

RAMPIAS, T.; SASAKI, C.; PSYRRI, A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. **Oral Oncology**, 2013.

RAMSHANKAR, V.; KRISHNAMURTHY, A. Human papilloma virus in head and neck cancers-role and relevance in clinical management. **Indian Journal of Surgical Oncology**, v. 4, n. 1, p. 59-66, 2013.

RAUTAVA, J.; SYRJÄNEN, S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. **Head and Neck Pathology**, v. 6, n. 1, p. 3-15, 2012.

REMMERBACH, T. W.; MATHES, S. N.; WEIDENBACH, H.; HEMPRICH, A.; BÖCKING A. Nichtinvasive Bürstenbiopsie als innovative Methode in der Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms. **Mund Kiefer Gesichtschir**, v. 8, n. 4, p. 229-236, 2004.

RIVERO, E. R. C.; NEVES, A. C.; VALENZUELA, M. G. S.; SOUZA, S. O. M.; NUNES, F. D. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Pathology Research and Practice**, v. 202, n.7, p. 523–529, 2006.

RIVERO, E. R. C.; NUNES, F. D. HPV em carcinoma epidermóide de boca em população brasileira: amplificação por PCR. **Brazilian Oral Research**, v. 20, n. 1, p. 21-24, 2006.

SAFAEIAN, M.; PORRAS, C.; SCHIFFMAN, M.; RODRIGUEZ, A. C.; WACHOLDER, S.; GONZALEZ, P.; QUINT, W.; VAN DOORN, L. J.; SHERMAN, M. E.; XHENSEVAL, V.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A. Epidemiological study of anti-HPV16/18 seropositivity and subsequent risk of HPV16 and -18 infections. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 102, n. 21, p. 1653-1662, 2010.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, n.4839, p. 487-491, 1988.

SANKARANARAYANAN, R.; MATHEW, B.; JACOB, B. J.; THOMAS, G.; SOMANATHAN, T.; PISANI, P.; PANDEY, M.; RAMADAS, K.; NAJEEB, K.; ABRAHAM, E. Early findings from a community based, cluster randomized, controlled oral cancer screening trial in Kerala, India. **Cancer**, v. 88, n. 3, p. 664-673, 2000.

SCHEIFELE, C.; REICHART, P. A. Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? **Oral Oncology**, v. 39, p. 470-475, 2003.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, p. 727-746, 2005.

SCHIFFMAN, M.; RODRIGUEZ, A.; CHEN, Z.; WACHOLDER, S.; HERRERO, R.; HILDESHEIM, A.; DESALLE, R.; BEFANO, B.; YU, K.; SAFAEIAN, M.; SHERMAN, M. E.; MORALES, J.; GUILLEN, D.; ALFARO, M.; HUTCHINSON, M.; SOLOMON, D.; CASTLE, P. E.; BURK, R. D. A population based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence and cervical neoplasia. **American Journal of Cancer**, v.70, n. 8, p. 3159-3169, 2010.

SCHNETLER, J. F. Oral câncer diagnosis and delays in referral. **Brazilian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 30, n. 4, p. 210-213, 1992.

SCIUBBA, J. J. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. **Journal of Amercian Dental Association**, v.130, n.10, p. 1445-1457, 1999.

SEETHALA, R. R.; WEINREB, I.; CARLSON, D. L.; McHUGH, J. B.; HARRISON, L. B.; RICHARDSON, M. S.; SHAH, J.; FERRIS, R. L.; WENIG, B. M. THOMPSON, L. D. R. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Carcinomas of the Pharynx. **Head & Neck**, version: Pharynx 3.3.0.0, 2013.

SMITH, D. F.; MALEKI, Z.; COUGHLAN, D.; GOOI, Z.; AKPENG, B.; OGAWA, T.; BISHOP, J. A.; FRICK, K. D.; AGRAWAL, N.; GOURIN, C. G.; HA, P. K.; KOCH, W. M.; RICHMON, J. D.; WESTRA, W. H.; PAI, S. I. Human papillomavirus status of head and neck cancer as determined in cytologic specimens using the hybrid-capture 2 assay. **Oral Oncology**, v. 50, n. 6, p. 600-604, 2014.

SMITH, E. M.; RITCHIE, J. M.; SUMMERSGILL, K. F.; HOFFMAN, H. T.; WANG, D. H.; HAUGEN, T. H.; TUREK, L. P. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 6, p. 449-455, 2004.

SMITH, E. M.; RUBENSTEIN, L. M.; HAUGEN, T. H.; PAWLITA, M.; TUREK, L. P. Complex Etiology Underlies Risk and Survival in Head and Neck Cancer Human Papillomavirus, Tobacco, and Alcohol: A Case for Multifactor Disease. **Journal of Oncology**, 2012.

SMITH, E. M.; WANG, D.; KIM, Y.; RUBENSTEIN, L. M.; LEE, J. H.; HAUGEN, T. H.; TUREK, L. P. p16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 44, n. 2, p. 133-142, 2008.

SNIJDERS, P. J.; HEIDEMAN, D. A.; MEIJER, C. J. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 6-7, p. 520-528, 2010.

SOARES, C. P.; MALAVAZI, I.; dos REIS, R. O.; NEVES, K. A.; ZUANON, J. A. S.; BENATTI NETO, C.; SPOLIDÓRIO, L. C.; de OLIVEIRA, M. R. B. Presença do papilomavirus humano em lesões

malignas de mucosa oral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 439-444, 2002.

SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY AND END RESULTS PROGRAM (SEER). SEER stat fact sheets: oral cavity and pharynx câncer. Disponível em: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>. Acesso em junho de 2014.

SYRJÄNEN, S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. **Annals of Oncology**, v. 21, n. 7, p. 243-245, 2010.

SYRJÄNEN, K. J.; SYRJÄNEN, S. M.; LAMBERG, M. A.; PYRHÖNEN, S.; NUUTINEN, J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. **International Journal of Oral Surgery**, v. 12, n. 6, p. 418-424, 1983.

TATE, J. E.; YANG, Y. C.; SHEN, J.; MCLACHLIN, C. M.; SHEETS, E. E.; CRUM, C. P. A comparison of early (E7) and late (L1) primer-mediated amplification of papillomaviral DNA in cervical neoplasia. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 5, p. 347-351, 1996.

TAKES, R. P.; RINALDO, A.; SILVER, C.E.; PICCIRILLO, J.F.; HAIGENTZ, M. J. R.; SUÁREZ, C.; van der POORTEN, V.; HERMANS, R.; RODRIGO, J. P.; DEVANEY, K. O.; FERLITO A. Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 32, n. 12, p. 1693-1711, 2010.

TERMINE, N.; PANZARELLA, V.; FALASCHINI, S.; RUSSO, A.; MATRANGA, D.; LO MUZIO, L.; CAMPISI, G. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis(1988-2007). **Annals of Oncology**, v. 19, n. 10, p. 1681-1690, 2008.

TEZAL, M.; SULLIVAN, M. A.; HYLAND, A.; MARSHALL, J. R.; STOLER, D.; REID, M. E.; LOREE, T. R.; RIGUAL, N. R.; MERZIANU, M.; HAUCK, L.; LILLIS, C.; WACTAWSKI-WENDE, J.; SCANNAPIECO, F. A. Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 9, p. 2406-2412, 2009.

VENUTI, A.; PAOLINI, F. HPV detection methods in head and neck cancer. **Head and Neck Pathology**, v. 6, n. 1, p. 63-74, 2012.

VIDAL, L.; GILLISON, M. L. Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a distinct disease type. **Hematology and Oncology Clinics of North America**, v. 22, n. 6, p. 1125-1142, 2008.

WANG, Q.; GRIFFIN, H.; SOUTHERN, S.; JACKSON, D.; MARTIN, A. McIntosh, P.; DAVY, C.; MASTERSON, P. J.; WALKER, P. A.; LASKEY, P.; OMARY, M. B.; DOORBAR, J. Functional analysis of the human papillomavirus type 16 E1^{E4} protein provides a mechanism for in vivo and in vitro keratin filament reorganization. **Journal of Virology**, v. 78, n. 2, p. 821-833, 2004.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, 2009.

WESTRA, W. H. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: Evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. **Oral Oncology**, v. 50, n. 9, p. 771-779, 2014.

WINDER, D. M.; BALL, S. L.; VAUGHAN, K.; HANNA, N.; WOO, Y. L.; FRÄNZER, J. T.; STERLING, J. C.; STANLEY, M. A.; SUDHOFF, H.; GOON, P. K. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. **BMC Cancer**, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Organização Mundial da Saúde. International Agency for Research on Cancer (IARC). Pathology and genetic of head and neck tumours. IARC Press: Lyon, 2005. 435p.

ZARAVINOS, A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. **Oncotarget**, v. 5, n. 12, p. 3956-3969, 2014.

ZARAVINOS, A.; MAMMAS, I. N.; SOURVINOS, G.; SPANDIDOS, D. A. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). **The International Journal of Biological Markers**, v. 24, n. 4, p. 215-222, 2009.

ZHAO, M.; ROSENBAUM, E.; CARVALHO, A. L.; KOCH, W.; JIANG, W.; SIDRANSKY, D.; CALIFANO, J. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. **International Journal of Cancer**, v. 117, n. 4, p. 605-610, 2005.

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise citológica de lesões bucais pré-malignas e malignas e aplicação de métodos adjuvantes

Pesquisador: Alexandre Shertley Casimiro Onofre

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08309512.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 144.430

Data da Relatoria: 12/11/2012

Apresentação do Projeto:

O câncer de boca, que inclui o câncer de lábio e de cavidade oral, é uma importante causa de óbito por neoplasias, sendo esperados mais de 14 mil

novos casos para o Brasil no ano de 2012 e representa uma causa importante de morbimortalidade uma vez que mais de 50% dos casos são

diagnosticados em estágios avançados da doença. A coleta de amostras bucais por biópsia com subsequente análise histológica ainda é o padrão

ouro para o diagnóstico de lesões bucais pré-malignas e malignas, contudo este procedimento é cirúrgico e invasivo, podendo apresentar

implicações para o paciente e exigindo habilidades técnicas do profissional de Odontologia que a executa. Neste sentido, faz-se necessária a

identificação de ferramentas diagnósticas minimamente ou não invasivas, para auxiliar no diagnóstico clínico de lesões com suspeita de malignidade

e ajudar a determinar os melhores locais para realização da biópsia. O objetivo deste estudo é avaliar lesões pré-malignas e malignas da cavidade

bucal de pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC),

utilizando métodos citológicos e adjuvantes, tais como pesquisa de HPV, AgNOR, FISH e citometria de imagem do DNA. Com isso, espera-se

proporcionar uma opção diagnóstica segura, simples e não invasiva para os casos duvidosos ou

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

Bairro: Trindade CEP: 88.040-900

UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3721-0208

Fax: (48)3721-9898

E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

suspeitos de malignidade da cavidade bucal,
oferecendo um menor sofrimento aos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário:**

Avaliar lesões bucais com diagnóstico clínico de pré-malignas e malignas de origem epitelial, utilizando métodos histológicos, citológicos e
adjuvantes, tais como pesquisa de HPV, AgNOR, FISH e citometria de imagem do DNA.

Objetivo Secundário:

A partir da suspeita clínica da presença de lesões pré-malignas e malignas epiteliais, dos pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia do

Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC), buscaremos: Auxiliar no diagnóstico

clínico destas lesões; Avaliar a prevalência e os tipos do Papilomavírus Humano (HPV) das lesões; Comparar os resultados obtidos pelos métodos da

citologia convencional, citologia de base líquida e exame histopatológico; Avaliar a quantidade e tamanho das AgNORs presentes nas células

epiteliais; Avaliar a aneuploidia do DNA nas células epiteliais, através da citometria de imagem. Investigar o valor diagnóstico do ganho do

cromossomo 7p12 (EGFR); Comparar a variação no número de cópias da região cromossomal 7p12 (EGFR) com pacientes normais e pacientes com

lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral; Verificar se a aberração cromossômica na região cromossomal 7p12 (EGFR) ocorre cedo na

tumorigênese; Determinar se a alteração específica nesta região cromossomal pode ser usada como marcador de tumor em células da cavidade oral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos:**

Não haverá risco aos pacientes. Os procedimentos clínicos já são feitos rotineiramente no Ambulatório de Estomatologia do HU/UFSC, exceto a

coleta com escova, a qual não oferece desconforto ou risco ao paciente.

Benefícios:

Visto que as altas taxas de morbimortalidade causadas pelo câncer da cavidade bucal ocorrem principalmente devido à detecção tardia da doença,

faz-se necessário o desenvolvimento de métodos mais objetivos para estabelecer o diagnóstico precoce de malignidade em diferentes lesões pré-neoplásicas.

A citologia estoliativa acompanhada por métodos adjuvantes, como a citometria de imagem do

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-900

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3721-0208

Fax: (48)3721-9698

E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

DNA, FISH e a técnica de AgNOR, poderão oferecer opções diagnósticas seguras nos casos duvidosos ou suspeitos para a presença de células epiteliais malignas, permitindo detectar com antecedência e com especificidade e sensibilidade próximas a 100% o câncer da cavidade bucal. Além disso, seu uso poderá evitar procedimentos diagnósticos invasivos, proporcionando maior conforto e menor sofrimento ao paciente

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está adequada e é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta todos os termos de apresentação obrigatória. Na apresentação anterior a este CEP, havia ficado em "pendência" por não constar espaço para anuência para os sujeitos da pesquisa menores de 18 anos e maiores de 07 anos. A pendência foi sanada.

Recomendações:

não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

FLORIANOPOLIS, 12 de Novembro de 2012

Assinador por:

Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br